



TITLE:

Pregnenoloneは分裂期のcentriole engagementを制御する(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

Sano(Hamasaki), Mayumi

CITATION:

Sano(Hamasaki), Mayumi. Pregnenoloneは分裂期のcentriole engagementを制御する. 京都大学, 2015, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2015-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18703>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016/01/22に公開; 許諾条件により要旨は2015/04/22に公開

Pregnenolone は分裂期の centriole engagement を制御する

佐野（濱崎） 眞弓

目次

要旨 1～2

第1章 序章 3～7

第2章 材料と方法 8～14

第3章 結果 15～42

第4章 考察 43～45

参考文献 46～51

謝辞 52～53

要旨

細胞分裂はこれまで多くのキナーゼなどのタンパク質が関わっていることが検証されてきたが脂質や代謝物質の機能についてはほとんどわかっていない。私は、コレステロール代謝物質の Pregnenolone(P5)が分裂期の centriole engagement を制御することを見出した。P5 はチトクロム P450 ファミリーの一つである Cyp11a1 により Cholesterol から代謝されて合成される。この物質はすべてのステロイドホルモンの前駆体で、生体内の恒常性の維持に必須の物質である。HeLa 細胞を用いて P5 の細胞周期における濃度の変化を検討すると、分裂期をピークに P5 の濃度が変動していることが分かった。また、細胞内の局在を観察すると P5 は分裂期の紡錘体極に集積が見られた。そこで、RNA 干渉法により Cyp11a1 をノックダウンし細胞内の P5 を欠失させると紡錘体が多極化している細胞が増加していた。Cyp11a1 をノックダウンした細胞に P5 やその下流の代謝物を添加すると、P5 を加えた細胞でのみ紡錘体の多極化がレスキューされた。この多極化は中心体複製の異常ではなく、本来 anaphase で起こる centriole disengagement が早期に起こることが原因であった。複製された後の二つの centriole は、Cohesin などの接着タンパク質により繋ぎ止められている。分裂期に入ると、prophase において Plk1 が接着タンパク質をリン酸化し、anaphase において Separase が接着タンパク質を切断することによって、二つの centriole は分裂期の終わりに解離する。私は、P5 が prophase における centriole engagement の維持に機能していることを見出した。prophase での centriole engagement は、short-Shugoshin1(sSgo1)が接着タンパク質を Plk1 から保護することによって維持している。その際、P5 は sSgo1 の N 末端のコ

イルドコイル領域に直接結合し sSgo1 を紡錘体極に局在化させることで、分裂期における centriole engagement を維持していることが分かった。

第 1 章

序論

ステロイドはコレステロールを原料として体内の酵素により合成される代謝物質で、恒常性の維持や性分化に必須の物質である。Pregnenolone(P5)(図 A 右)は、Cholesterol(Chol)(図 A 左)からチトクロム P450 ファミリーの Cyp11a1 により代謝されて生成するステロイド化合物である。P5 はさらに下流の Cyp17a1 や HSD3B などによって代謝され、17OH-Pregnenolone(17OH-P5) や Progesterone(P4)に変換し、その後、一連のステロイド代謝経路によって糖質コルチコイド、鉱質コルチコイド、性ホルモンに変換される (Miller, 1988)。

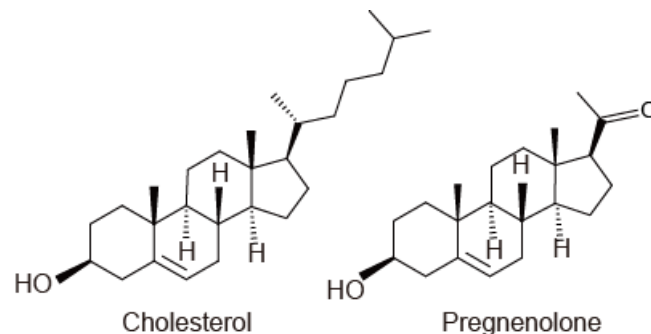


図 A Cholesterol(左)、Pregnenolone(右)の化学構造式

ステロイドホルモンは、結合タンパクとともに核内で標的遺伝子の転写活性を調節するゲノミック作用がよく知られている (Edwards, 2000) (Andrew C et al., 2002)。しかし近年、P5 は神経細胞で微小管結合タンパク質の MAP2 と相互作用し、微小管の重合と樹状突起の伸長を促進すること (Murakami et al., 2000; Mizota and Ueda, 2008) や、ゼブラフィッシュの発生過程で微小管のダイナミクスの制御 (Hsu et al., 2006) など、遺伝子発現を伴わないノンゲノミック作用を持つことが分かってきた。細胞分裂とステロイド化合物の関連については、細胞内のコレステロールが細胞周期の進行に伴って変動すること、細胞分裂の進行にコレステロールが必要であることが報告されている (Chen et al., 1974; Fernandez et al., 2004)。しかし、細胞分裂におけるステロイド化合物の作用機序はほとんど明らかにされていない。中心体は、二つの中心小体と

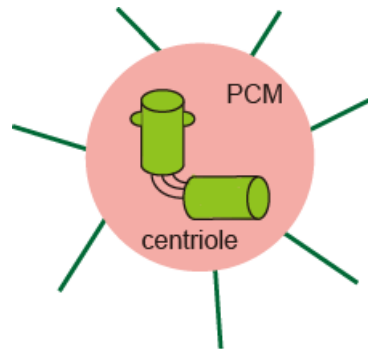
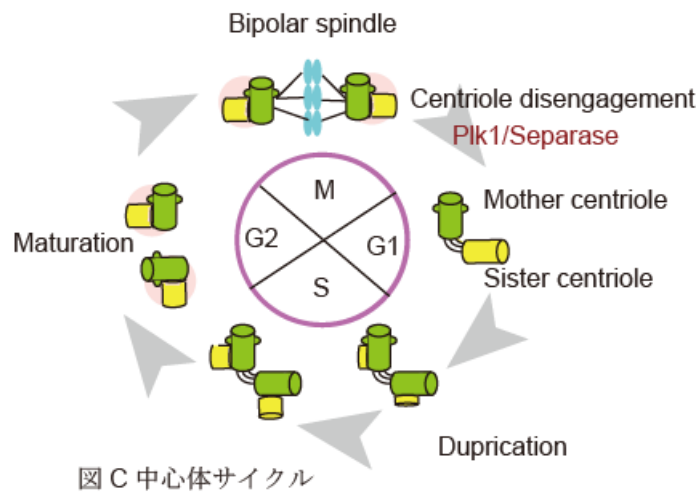


図 B 中心体と中心小体

それを取り囲む中心体周辺物質からなる細胞小器官(Bornens, 2002)(図 B)で、微小管形成中心として機能している。細胞分裂の進行に伴って、娘中心小体は S 期で複製される(Nigg, 2007; Bettencourt-Dias and Glover DM, 2007)。(図 C)複製された中心小体は、既存の母中心小体に直行して伸長、成熟し、互いに接着した状態を維持する(centriole engagement)。M 期になると中心体は紡錘体極として機能し、anaphase 以降で結合していた中心小体は分離する(centriole disengagement)。この centriole disengagement が次の中心小体複製へのライセンスとして機能している (Kuriyama and Borisy, 1981; Tsou and Stearns, 2006; Nigg, 2007)。中心体のサイクルは細胞周期と深く関連し、細胞分裂における染色体分配が正常に行われるためには分裂期の紡錘体極が正しく二極に配置し、分裂期の間は centriole engagement が維持されることが重要である。早期の centriole disengagement は紡錘体の多極化や染色体異数性を誘導し (Keryer et al., 1984; Sluder and Rieder, 1985; Hut et al., 2003)、腫瘍形成の原因となる (Nigg and Raff, 2009; Fukasawa, 2007)。近年、centriole engagement は姉妹染色体の接着とよく似たメカニズムで接着タンパク質を切断することにより分離が起こることが分かってきた。姉妹染色体は分裂期において、Cohesin により接着しているが Cohesin (SA サブユニット)が Plk1 に



よりリン酸化を受けると染色体腕部から解離する(prophase pathway)。その際、Shugoshin 1 (Sgo1)は PP2A と協調して Plk1 に拮抗しセントロメアにおける Cohesin の保護を行い(Waizenegger et al., 2000; Sumara et al., 2002 Kitajima et al., 2006; Reidel et al., 2006) anaphase で Separase により Cohesin が切断されるまで姉妹染色体の接着を維持している。タンパク分解酵素の Separase は metaphase において、抑制因子である Securin と結合し活性が抑えられている。anaphase になると APC(anaphase promoting complex)がユビキチンライゲースとして機能することで Securin をユビキチン化する。ユビキチン化された Securin はプロテアソームにより分解されると、Separase が活性化しセントロメアの接着因子である Cohesin のサブユニットの Scc1 に切断が起こり、姉妹染色体が分離する (Uhlmann et al., 1999, 2000)。最近、中心体にも Scc1 が局在し、centriole engagement に働いていることが報告された (Nakamura et al., 2009; Schockel et al., 2011)。また、anaphase において Separase により Scc1 や Pericentrin などの接着タンパク質が切断され centriole disengagement が起こることも報告されている、早期の Separase の活性化は多極紡錘体を誘導する (Tsou and Stearns, 2006; Thein et al., 2007 ;

Tsou et al., 2009, Matsuo et al., 2012; Lee and Rhee, 2012) 。さらに、centriole disengagement の誘導に、Polo-like kinase 1 (Plk1)が関与することや (Tsou et al., 2009)、 Sgo1 の splice variant である short-Shugoshin が紡錘体極に局在し、分裂期の centriole engagement の維持に働くことが分かってきた (Wang et al., 2008)。しかし、分裂期で sSgo1 が紡錘体極に留まった状態を維持する機序については不明である。本研究では、P5 が sSgo1 と N 末端のコイルドコイル領域に直接結合することで、prophase pathway での centriole engagement の維持に機能していることを見出した。

第 2 章

材料と方法

第 2 章 材料と方法

細胞培養

HeLa 細胞、A549 細胞、HEK293T 細胞は DMEM(10%FCS)培地、SW13 細胞は DMEM/F12 (5%FCS)培地で培養した。解析を行う際、細胞は全てフィブロネクチンで処理したプレート上で培養した。分裂期の解析はノコタゾールで 18 時間処理を行うか、ダブルチミジンプロック法により G2/M 期に同調させた。

試薬、抗体

P5、P4、17-OH-P5、aminoglutethimide (Sigma)、FITC-Cholesterol (NANOCs)、RITC-tubulin(Cytoskeleton)は購入した。FITC-P5 (Hsu et al., 2006)は Fujimoto Molecular Planning に化学合成を依頼した。抗体は anti-Cyp11a1 (ab67355・Abcam,B3997・LSBio),anti-Hsd3b (ab55658・Abcam),anti-Sgo1 (ab21633・Abcam,WH0151648M1・Sigma),anti-Plk1 (# 06-813・Upstate, #377000・Invitrogen),anti-Centrin2 (sc-27793-R・Santa Cruz),anti-Centrin (04-1624・Millipore),anti-Cep135 (ab75005・Abcam),anti-GFP (#632381・Clontech,04404-84・Nakalai),anti- α -tubulin (T6199・Sigma),anti- γ -tubulin (T5192,T6557・Sigma),anti-AuroraA (610938・BD phamingen),anti-Pericentrin (LN#14923401・Covance), anti-CyclinB1 (sc752・Santa Cruz)、anti-cNAP1 (sc135851・Santa Cruz)を購入した。anti-Kendrin は帝京平成大学 高橋美樹子先生に分与していただいた。

プラスミドコンストラクト、トランスフェクション

CYP11A1 はマウスの卵巣から作成した cDNA をテンプレートとして

KOD-Plus-Neo (TOYOBO)を用いて PCR を行い pEGFP-N1 (Clontech) ベクターに導入し作成した。(プライマーの配列：
 5'-ATCTCGAGATGCTGGCTAAAGGACTTTCCC-3'
 5'-TGCTCGAGGTTTACAGTGTTGTCTTTTCTG-3') sSGO1-Nter は
 pDNR-LIB-sSGO1 (Thermo Scientific) プラスミドを購入し、Sgo1 と sSgo1 に共通部位の 158 アミノ酸を PCR により増幅させ pEGFP-C1 (Clontech) または pENTR4-GFP-C1 (Addgene) (Campeau et al., 2009) ベクターに導入した。
 YFP-Securin-WT、YFP-Securin-ΔD (Hagting et al., 2002)は Addgene で購入したものを用いた。A549 細胞、HEK293T 細胞、HeLa 細胞へのプラスミドトランスフェクションは Lipofectamine Plus (Invitrogen)を用いた。

RNA 干渉法

RNA 干渉法はオリゴ 20μM を Oligofectamine (Invitrogen)を用いて 4 時間培養した。培地交換後からダブルチミジンブロックを行い分裂期に同調させて解析した。発現抑制の確認はウエスタンブロッティング、または RT-PCR 法を行った。使用したオリゴの配列は以下のとおり

	配列
human Cyp11a1 siRNA-1	5'-GUAAAUGACUUGGUUCUUCUU-3' (Thermo Scientific)
human Cyp11a1 siRNA-2	5'-GAUGUGGCCCUUCUCUUUAUU-3'(Thermo Scientific)
human Hsd3b	5'-UGUCA AUGUGAAAGGUACCUU-3'(日本バイオサービス)
human Sgo1	5'-UGAAAGAAGCCCAAGAUUUU-3' (日本バイオサービス)

RT-PCR 法、q-PCR 法

分裂期に同調させた細胞から RNeasy Micro kit (QIAGEN) により RNA を精製した。M-MLV RT (Invitrogen) で RNA (1 μ g) を逆転写反応により cDNA を合成し RT-PCR、q-PCR を行った。プライマーの配列は以下のとおり

sSog1 (exon9):5'- AGGGGACCCTTTTACAGATT-3'

5'- AATTGCTTCTTTGGCAGGTG-3'

ウエスタンブロッティング

M 期に同調した A549 細胞、HEK293T 細胞、HeLa 細胞を lysis buffer で細胞を溶解し(20mM HEPES, pH 7.3, 25mM 2-glycerophosphate, 50mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 2 mM DTT, 1mM PMSF, 1mM sodium vanadate, 2 μ g/ml aprotinin, and 100nM okadaic acid) 20,000 g for 15 分遠心後、上清を Laemmli' s sample buffer でサンプルを処理しウエスタンブロッティングを行った。Cyp11a1 と cytochrome C の ウエスタンブロッティングに用いたサンプルは mitochondria isolation kit for mammalian cells (Thermo)を使用してミトコンドリアを分画し溶解したものをを用いた。

ステロイドの濃度測定

HeLa 細胞、SW13 細胞をそれぞれ lysis buffer で溶解し抽出液を用いて Pregnenolone-ELISA assay kit (BioVender Laboratory), Enzyme Immunoassay kit (Cayman Chemical), and DHEA ELISA assay kit (IBL International) で細胞内のステロイドの濃度を測定した。補正はタンパク量を Bradford 法(pregnenolone の測定) または紫外吸収法(DHEA、estradiol の測定)で測定し解析に用いた。

細胞染色

細胞を固定後 3% BSA でブロッキング(30 分)を行い、1 次抗体を加えて 4℃一晩静置する。洗浄後、2 次抗体 (AlexaFluor 350-,488- or 546-goat anti-mouse, anti-rabbit, anti-rat IgG (Molecular Probes)を加えて 1 時間静置後観察した。抗体別の固定法は以下の通り

抗体	固定法 (試薬・反応条件)
α -tubulin , γ -tubulin	3.7% ホルマリン PBS 溶液・ 37℃ 10 分 ↓ メタノール・ -20℃ 5 分
Centrin2,Centrin, Cep135,c-Nap1,FITC-P5(マ イクロインジェクション)	メタノール・ -20℃ 2 分
AuroraA, pericentrin, sSgo1/Sgo1, GFP, Plk1	0.5% Triton X-100 in PHEM buffer60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, and 4 mM MgSO ₄)・ 37 °C 1 分 ↓ メタノール・ -20℃ 5 分 4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液 ・37℃ 10 分 (GFP のみ)

マイクロインジェクション

FITC-P5、FITC-Cholesterol (各 10 mM)、RITC-tubulin(4 mg/ml)をそれぞれ injection buffer (12 mM Hepes-KOH, pH7.5, and 120 mM KCl, 3% BSA)に溶かす。injection buffer: FITC-P5/FITC-Cholesterol: RITC-tubulin=3:1:1 の割合で混合し、Millex-GV 0.22 μ m filters (Millipore)でろ過し、溶液を 0.1 pl ずつ G2 期の HeLa 細胞に導入(FITC-P5/FITC-Cholesterol の細胞内の濃度は 80 nM.)し、2 時間後 M 期に進行したことを確認して固定した。マイクロインジェ

クシオンは IM-188 apparatus (Narishige)を使用した。

中心体精製

中心体精製は Moudjou (1994) らの方法を参考に行った。GFP-Sgo1-Nter を過剰発現させた HeLa 細胞に nocodazole (250 ng/ml)を加えて 18 時間培養し、分裂期に同調させた。cytochalasin D (1 μ g/ml) を加え 2 時間培養後細胞を回収し TBS(0.1 \times TBS/8% sucrose)で 2 回洗浄し、0.1 \times TBS/8% sucrose に 0.5% NP-40 lysis buffer を加え細胞を溶解させた。2,500 g で 10 分遠心後抽出液に Hepes, DNase(最終濃度 1 mM Hepes、1 μ g/ml DNase)を加え 4 $^{\circ}$ C で 30 分放置した。チューブに 60% ショ糖溶液を加えその上に抽出液をゆっくりと加えて 2 層になるようにして 15000 rpm で 30 分遠心した。遠心後、中心体が含まれている層を抜き取った。チューブに下から 70%、50%、40%のショ糖溶液を加え 3 層にし、40%ショ糖溶液の上に静かに中心体が含まれた溶液を加えた。このチューブを 25000 rpm で 1 時間遠心し、チューブの底に注射針で穴をあけ溶液を回収しウェスタンブロッティングにより γ -tubulin をブロットして中心体が抽出されていることを確認した。中心体からの脂質の除去は Cleassite (Biotech Support Group)を用いて脂質を取り除いた後、ショ糖密度勾配遠心分離を行った。

免疫沈降

Flag-Sgo1-Nter と GFP-Sgo1-Nter を共発現させた HeLa 細胞に nocodazole を 18 時間加えて分裂期に同調させた。回収前に cytochalasin D (1 μ g/ml) を加え 1 時間培養し、Plk1 binding buffer (50 mM Hepes (pH 7.4)、10 mM 2-glycerophosphate、50 mM NaCl、2 mM MgCl₂、2 mM EGTA、1

mM EDTA、5 mM NaF、10% glycerol、0.5% NP-40、5 mM dithiothreitol、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、5 mM Na₃VO₄、2μg/ml aprotinin、100nM okadaic acid)で細胞を溶解し、遠心後上清をチューブに移し抗体を加えて2時間反応させた。反応後、binding buffer で洗浄しサンプル処理を行った。

タンパク質精製 キナーゼアッセイ

His- mouse Plk1-WT と His-mousePlk1-KD は大腸菌に発現させて ProbondTM Resin (Invitrogen)によるアフィニティクロマトグラフィで精製した。GST-Sgo1-Nter-WT, GST-Sgo1-Nter-L68A, GST-Sgo1-Nter-S73A/T146A は pGEX-6P1 (Pharmacia Biotech, Inc)にクローニングし、発現ベクターを作成した。大腸菌に発現させ glutathione-Sepharose4B (Pharmacia)を用いたアフィニティクロマトグラフィで精製した。MBP-Sgo1-Nter-WT, MBP-Sgo1-Nter-(1-105) , MBP-Sgo1-Nter-(51-105) , MBP-Sgo1-Nter-(106-158) , MBP-Sgo1-Nter-L68A は pMAL-2c (BioLabs)にクローニングし、amylose resin (Biolabs)によるアフィニティクロマトグラフィで精製した。GST-Sgo1-Nter のキナーゼアッセイは、精製した His-Plk1 と混合し 50 μM ATP, 1.5 mM MgCl₂, 3μCi of [γ-³²P] ATP を加えて 30° C で 20 分反応させた。

リン酸化プロテオーム解析

解析は京都大学薬学部 石濱 泰 教授との共同研究により行った。His - mouse Plk1-WT と GST-Sgo1-Nter-WT を混合し 50 μM ATP 、1.5 mM MgCl₂ 加えて 30°C で 20 分 反応させた。混合物を V8 プロテアーゼで処理し ¹³CH₂O でラベルしたものを Nano LC-MS/MS により解析した。

第 3 章

結果

1 Pregnenolone は紡錘体に局在する

解析には HeLa 細胞を用いた。まず、細胞内の Pregnenolone の濃度を測定し、細胞周期進行における濃度の変動について検討した。nocodazol によって細胞周期を M 期に同調させた細胞を培地交換し、リリース後、0、3、6、9 時間における細胞内の P5 の量を測定した。P5 はリリース後分裂の進行に伴って徐々に減少し、9 時間後では明らかに P5 の濃度が減少した(図 1A)。さらに、ダブルチミジンブロックにより細胞周期を S 期に同調させ、チミジンリリース後 0 時間から 12 時間までの細胞内 P5 濃度を計時的に測定すると、細胞内の P5 はリリース直後から分裂前期まで濃度が維持されていたが分裂期が終了するに従い減少していた(図 1B 10-12h)。これらの測定により、分裂期に至るまでに細胞内で P5 濃度が上昇し、分裂期の終了に伴い減少することが分かった。

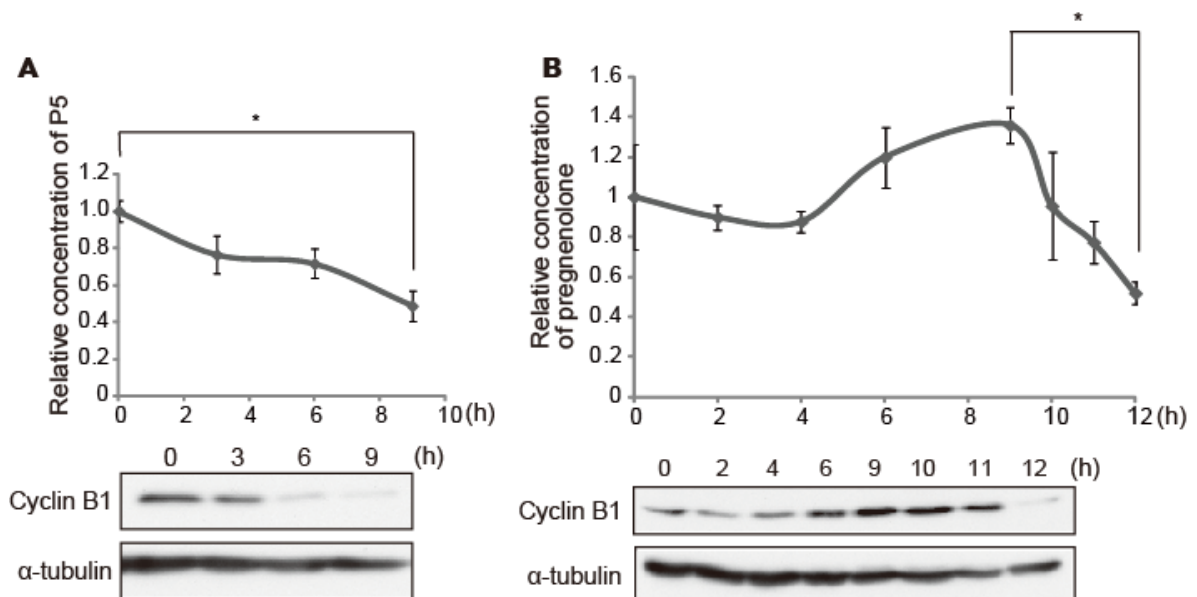


図1 Pregnenolone (P5) の細胞内濃度は細胞周期により変動する

(A) nocodazol 処理により M 期に同調させた HeLa 細胞内の P5 の濃度の割合 (mean \pm s.e.m. 6 回のデータを用いて t 検定を行った * $p < 0.01$)

(B) ダブルチミジンブロックにより細胞を S 期に同調させた際の HeLa 細胞内の P5 の濃度の割合 (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った * $p < 0.01$).

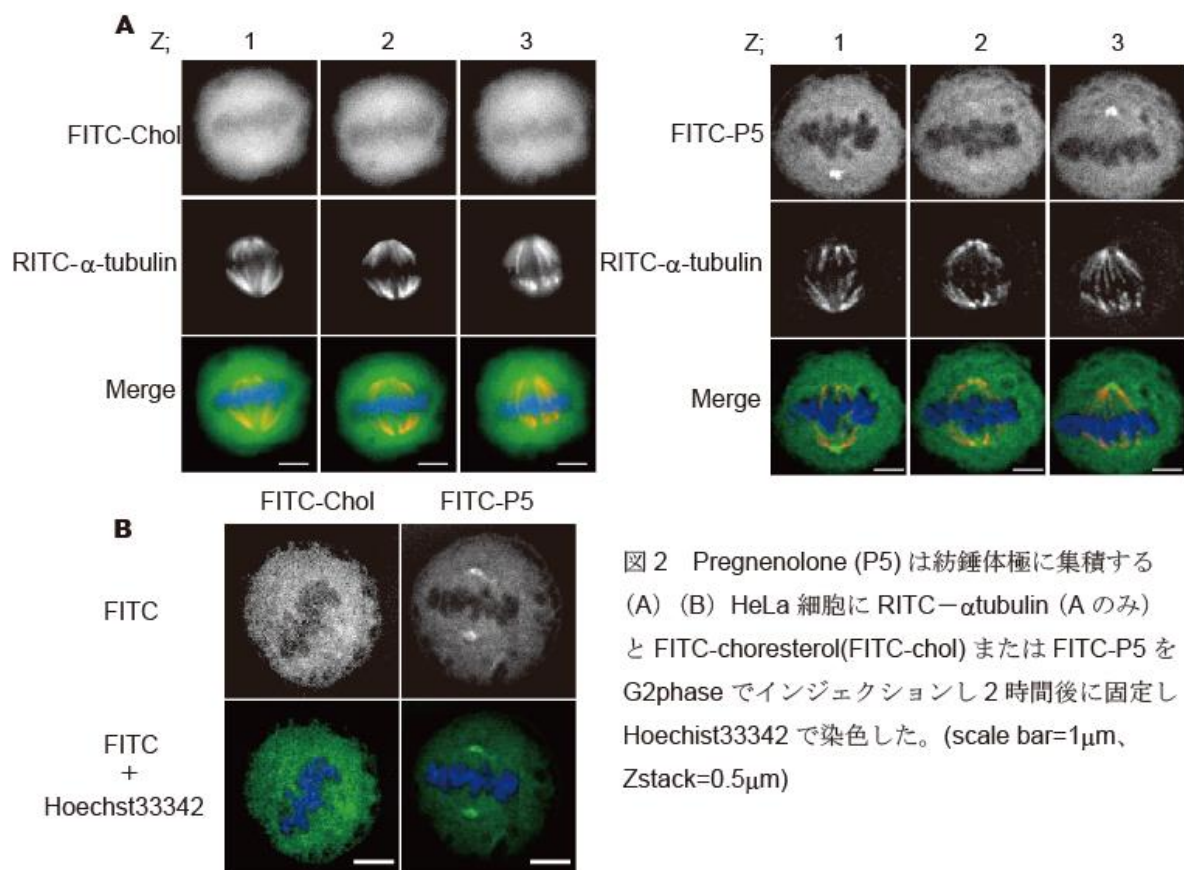


図2 Pregnenolone (P5) は紡錘体極に集積する (A) (B) HeLa 細胞に RITC- α tubulin (A のみ) と FITC-cholesterol (FITC-chol) または FITC-P5 を G2phase でインジェクションし 2 時間後に固定し Hoechst33342 で染色した。 (scale bar=1 μ m、Zstack=0.5 μ m)

次に分裂期における P5 の局在を確認するために、FITC を標識した P5 (FITC-P5) と RITC- α -tubulin を用いて HeLa 細胞にインジェクションを行った。コントロールの FITC-cholesterol (FITC-chol) は細胞質内に拡散してしまうが FITC-P5 は分裂期の細胞内の紡錘体極周辺に集積していた (図 2A)。FITC-P5 を単独でインジェクションした場合も同様に紡錘体極周辺への局在が確認できた (図 2B)。これらの結果により P5 は分裂期の紡錘体に局在し機能している可能性が示唆された。

2 P5 は分裂期における紡錘体極の形成に必要である

P5 は cholesterol (chol) から Cyp11a1 によって代謝され合成される。P5 はさらに Hsd3b1 や Cyp17a1 によってそれぞれ progesterone (P4) や 17-OH-pregnenolone (17-OH-P5) に変換されたのち、さらに下流の酵素により

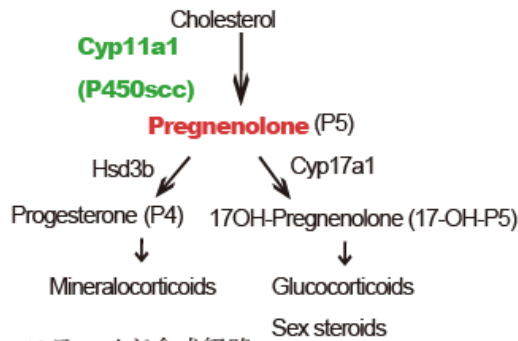


図3 ステロイド合成経路

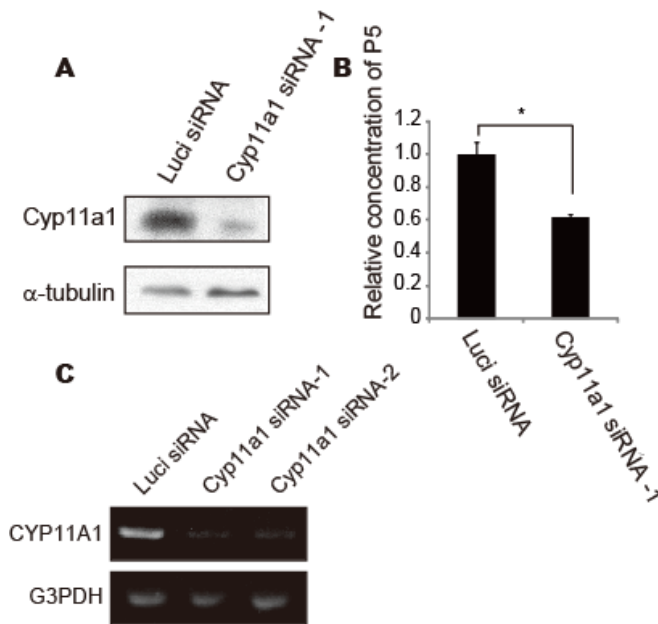


図4 P5はHeLa細胞で機能している
(A) HeLa細胞にLuciferase(Luci)とCyp11a1のsiRNAオリゴをそれぞれトランスフェクションしM期に同調させた細胞のCyp11a1の発現をウェスタンブロットにより確認した
(B) (A)の条件下でのP5濃度の割合(mean ± s.e.m. 3回のデータを用いてt検定を行った *p<0.01)
(C) HeLa細胞にLuciferase(Luci)と異なる2種類のCyp11a1の配列のsiRNAオリゴをそれぞれトランスフェクションしM期に同調させた細胞のCyp11a1の発現をRT-PCRにより確認した

代謝されてステロイドホルモンが合成される(図3)。Cyp11a1はステロイドホルモンを分泌する副腎皮質や卵巣などの細胞に多く発現していることが知られている(Lavoie and King,2009)が、他の器官や培養細胞での発現や機能についてはよくわかっていない。そこでHeLa細胞について、Cyp11a1を異なる2種類の配列のオリゴを用いてノックダウンし、RT-PCRとウェスタンブロットにより発現を確認した(図4A,4C)。同様の条件で細胞内P5の濃度測定を行ったところ、Cyp11a1の発現抑制によりP5の濃度が減少していることが示された(図4B)。これらの結果によりHeLa細胞においてCyp11a1やP5が機能していることが確認できたので、細胞分裂の過程に関わるかどうかを検討するために

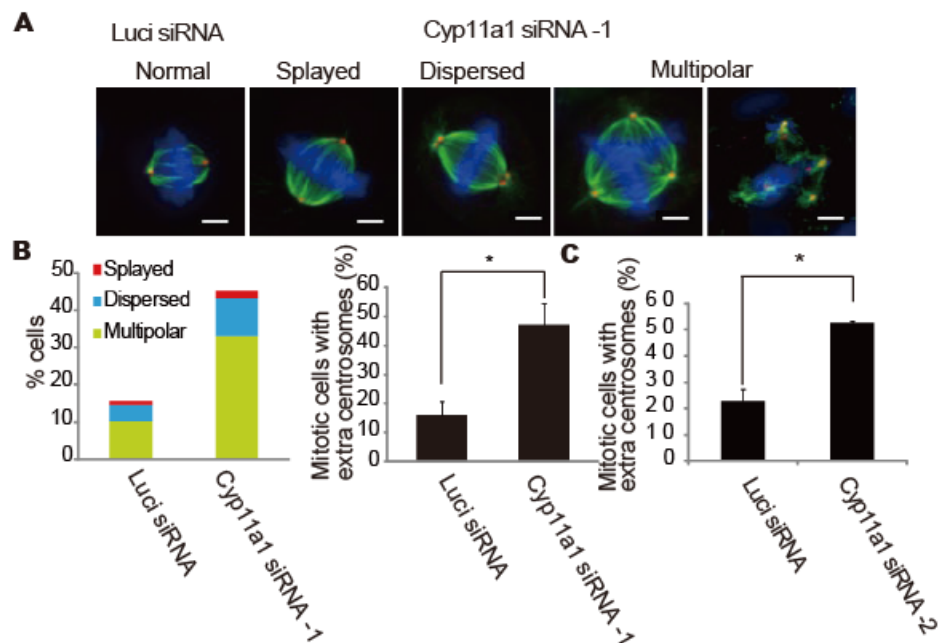


図5 Cyp11a1 のノックダウンにより多極紡錘体が誘導される

(A) M期の紡錘体の染色像。赤；g-tubulin、緑；a-tubulin、青；Hoechst33342

(B) (A) の定義に基づいて多極化した細胞を定量化した左側は3つの分類を色分けした。右は異常な形態をまとめたものをグラフにした。(mean \pm s.e.m. 3回のデータを用いて t 検定を行った $n > 100$, $p < 0.05$, scale bar=5mm)

(C) (B) と異なる配列の Cyp11a1 の siRNA オリゴをトランスフェクションした。(mean \pm s.e.m. 3回のデータを用いて t 検定を行った $n > 100$, $p < 0.05$)

Cyp11a1 をノックダウンした HeLa 細胞の分裂期の紡錘体を γ -tubulin で染色し観察した。コントロール群のほとんどの細胞は、metaphase において、両極に等しく分かれた紡錘体極を持ち正常な形態を示す(図 5A normal)。しかし Cyp11a1 をノックダウンした細胞は中心体が広がっているもの(図 5A;splayed)、分離しているもの(図 5A;dispersed)多極化しているもの(図 5A;Multipolar)が多く出現していた(図 5B 左)。これらを、定量化すると Cyp11a1 をノックダウンしたもので異常な紡錘体をもつ細胞が増えていることが分かった(図 5B 右)。これらの異常は、異なる配列の siRNA(Cyp11a1 siRNA-2)を用いた際も認められた(図 5C)。さらに、Cyp11a1 をノックダウンした細胞に Cyp11a1 の siRNA の標的部位と異なるマウスの Cyp11a1 を発現させると多極紡錘体の誘導がレスキ

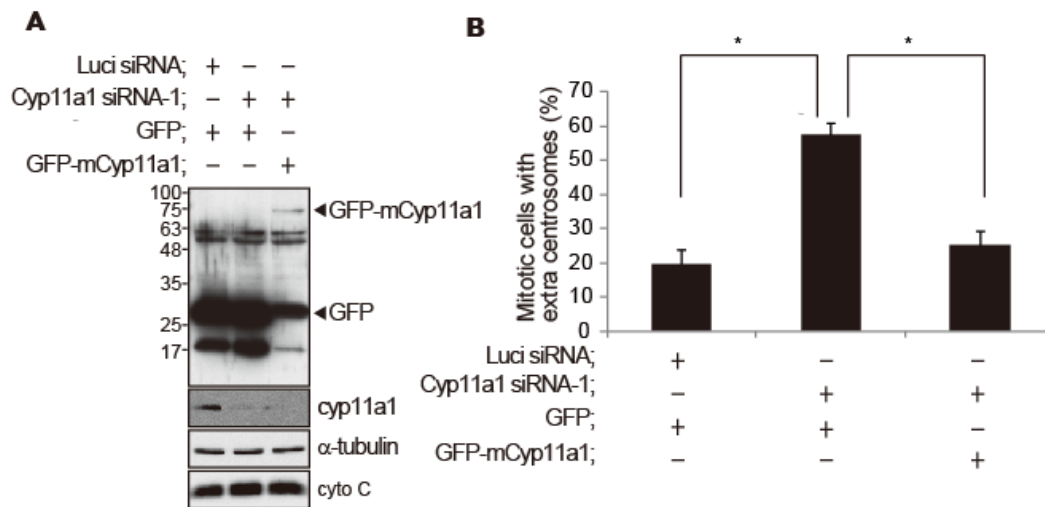


図6 Cyp11a1 のノックダウンにより多極紡錘体は siRNA 抵抗性の mCyp11a1 のトランスフェクションによりレスキューされる

(A) HeLa 細胞に Luciferase(Luci) と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし M 期に同調させた細胞に GFP,GFP-mCyp11a1 を発現させた際のウェスタンブロットによる確認 担当 ; 松村

(B) (A) の条件下で多極化した細胞を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてダネットの多重比較を行った $n>50$, * $p<0.01$)

ューされた(図 6A, 6B)ことから、Cyp11a1 のノックダウンによる紡錘体極の形態異常は siRNA によるオフターゲットではないことが示された。Cyp11a1 をノックダウンした細胞は、分裂期の細胞の数はコントロールの(Luci)細胞と変わらずに多極に分裂していた。(図 7A)。anaphase の染色体の観察やタイムラプスにより細胞分裂を経時的に観察すると、Cyp11a1 をノックダウンにより多極紡錘体に誘導された細胞は、そのまま多極に分裂していた(図 7B, 7C, 7D)。

3 P5 は分裂期における紡錘体極の機能を制御する

アロマターゼ阻害薬の Aminoglutetimid(AG)は高濃度で使用すると Cyp11a1 の活性を阻害して P5 の合成を抑制する (Graves and Salhanick, 1979; Uzigris et al., 1977)。Cyp11a1 の活性やその産物の P5 との関連について検討するために、AG を用いて分裂期の紡錘体を観察した。AG を 10 時間添加すると細胞内

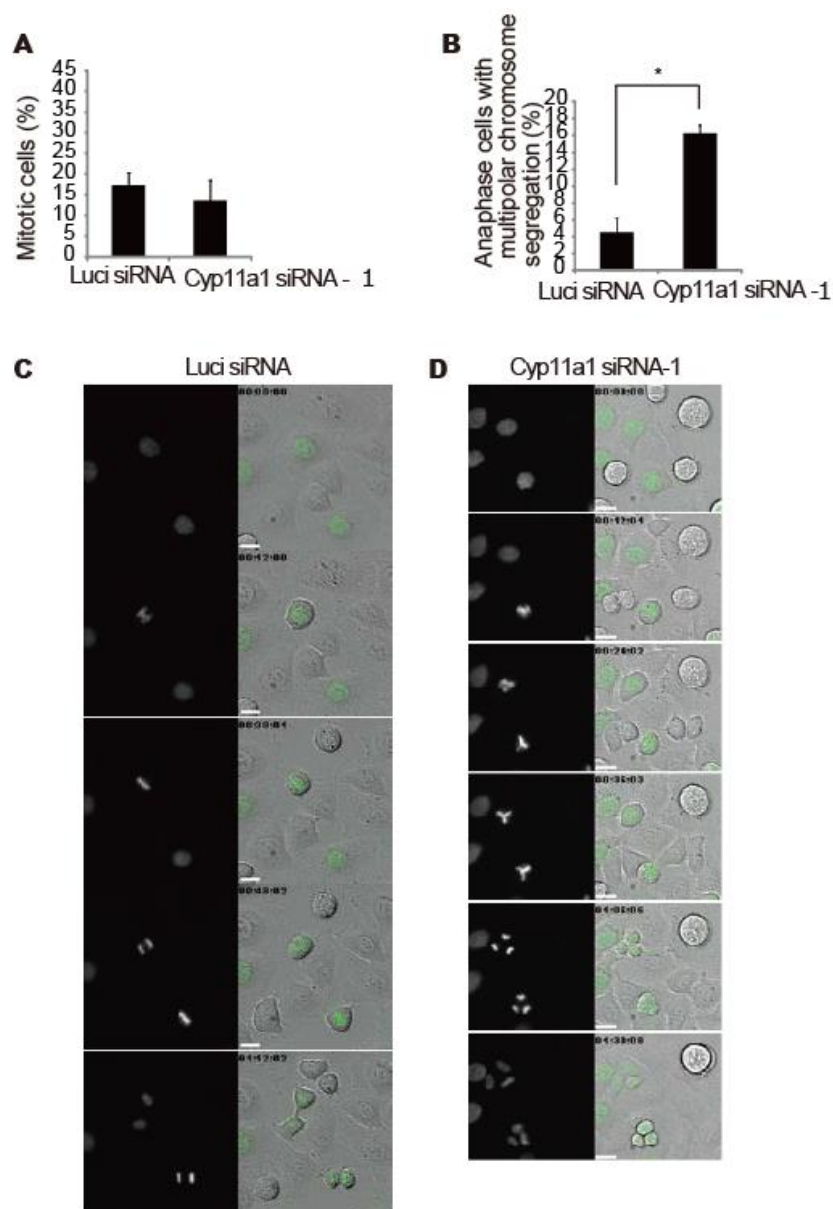


図7 細胞分裂の経時的な変化

(A) HeLa 細胞に Luciferase(Luci) と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし同調させた細胞の分裂期の細胞を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてグラフ化した)

(B) HeLa 細胞に Luciferase(Luci) と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし同調させた細胞の anaphase の染色体の分離が多極に起こっている細胞の割合を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n > 100$, * $p < 0.05$)

(C) Luci siRNA をトランスフェクションした際の経時的変化 担当；松村

(D) Cyp11a1 siRNA をトランスフェクションした際の経時的変化 担当；松村

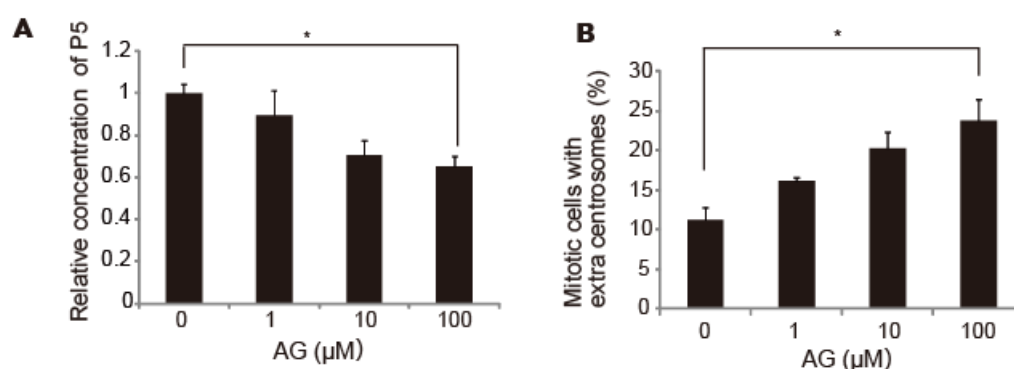


図 8 P5 の枯渇により紡錘体は多極化する

(A) HeLa 細胞 M 期に同調させ最終濃度 0–100mm の AG を添加して 10 時間後、細胞内の P5 の濃度を測定した (mean ± s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n>100$, $*p<0.01$)

(B) (A) の条件下での多極化した紡錘体の割合 (mean ± s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n>100$, $*p<0.05$)

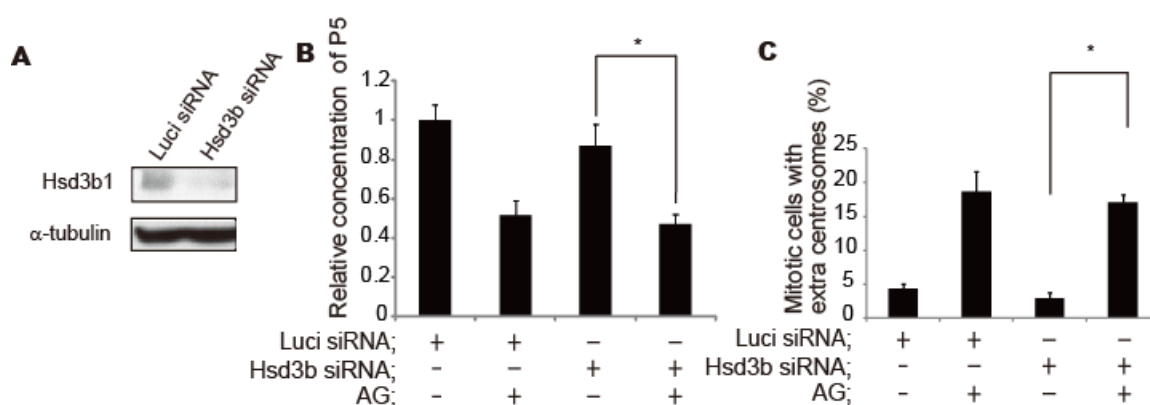


図 9 Hsd3b は紡錘体の形成には関与しない

(A) HeLa 細胞に Luciferase(Luci) と Hsd3b の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし M 期に同調させた細胞の Hsd3b の発現をウェスタンブロットにより確認した

(B) (B) の条件下に AG を 100mmAG 添加して 10 時間後、細胞内の P5 の濃度を測定した (mean ± s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $*p<0.05$)

(C) (B) の条件下で多極化した紡錘体の割合 (mean ± s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n>100$, $*p<0.01$)

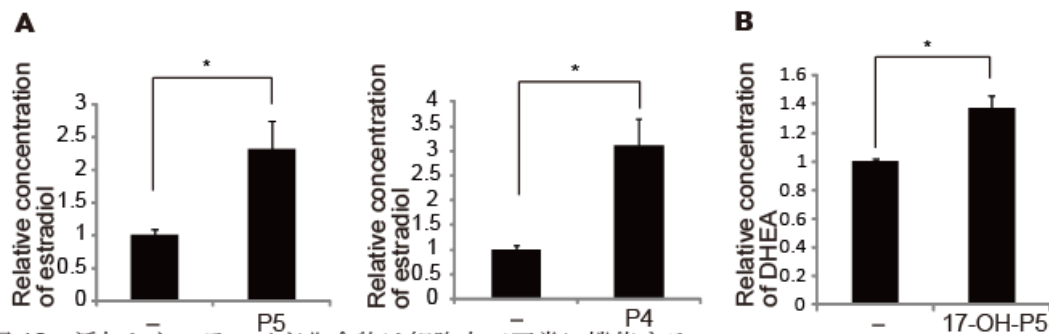


図 10 添加したステロイド化合物は細胞内で正常に機能する

(A) SW13 細胞に P5 (左) または P4 (右) を加えて 18 時間インキュベーションし細胞内の estradiol を測定した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った * $p < 0.05$)

(B) SW13 細胞に 17-OH-P5 を加えて 18 時間インキュベーションし細胞内の DHEA を測定した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った * $p < 0.05$)

の P5 の濃度は AG の濃度依存的に減少していた(図 8A)。このとき、紡錘体極の形態を観察すると AG の濃度依存的に紡錘体の多極化が増加した(図 8B)。P5 はさらに代謝され変換されるため、下流の酵素である HSD3B と Cyp17a1 について検討を行った。HSD3B をノックダウンしても紡錘体極の多極化は起こらなかった(図 9A,9C)。さらに HSD3B をノックダウンした細胞に AG を添加しても AG 単独の時と同様に P5 の濃度の現象や紡錘体の多極化が見られた(図 9B,9C)。Cyp17a1 については、HeLa 細胞で発現が確認できなかった(data not shown)。つぎに下流の代謝物質について検討した。実験に用いたステロイド化合物が細胞内で機能するかを確認するために SW13 細胞の培養液中に P5、P4、17-OH-P5 をそれぞれ加えてインキュベーションし、SW13 細胞内のエストラジオール(図 10A,10B)、または DHEA(図 10C)を測定して生理活性を有することを確認した。Cyp11a1 をノックダウンした細胞に P5、P4、17-OH-P5 を添加した。P4、17-OH-P5 を添加しても、Cyp11a1 の欠損による紡錘体極の多極化に変化は見られなかった(図 11B,C)が、P5 を添加すると濃度依存的に紡錘体は正常な形態にレスキューした。(図 11A)P5 を短時間(固定 2 時間前)に添加した際も同様に多極紡錘体がレスキューしたことから(図 11D)、P5 は分裂期において紡錘体の正

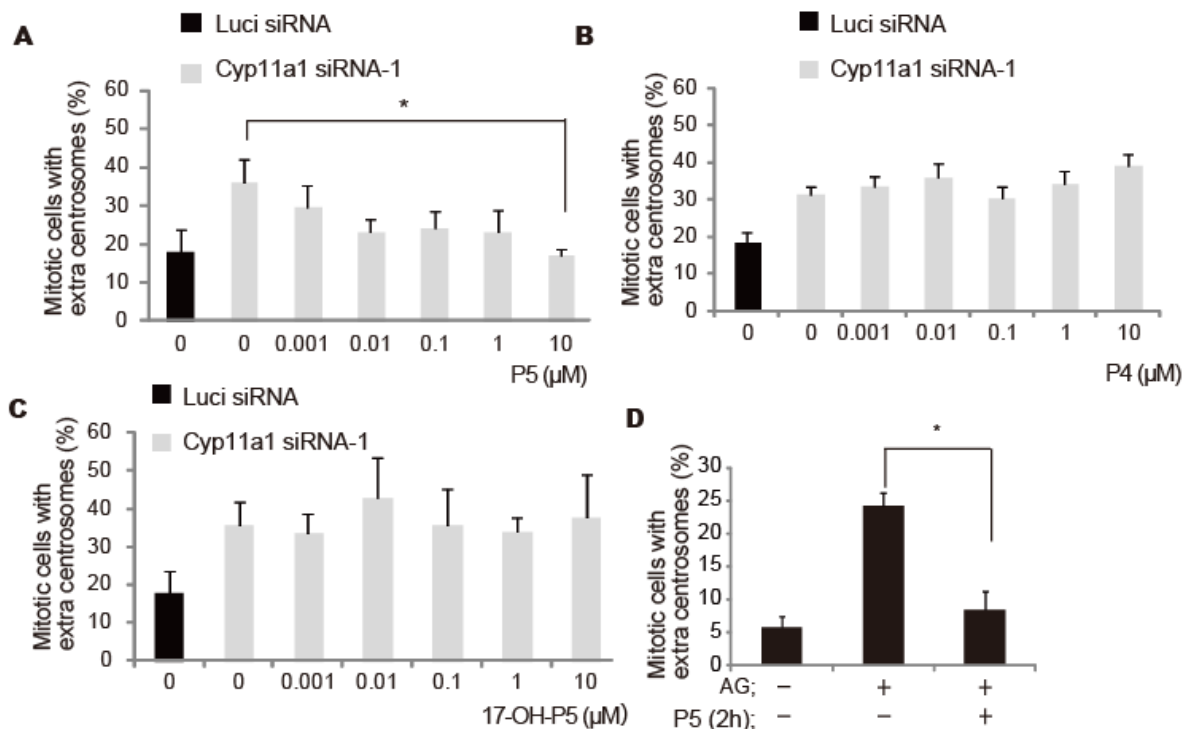


図 11 Cyp11a1 のノックダウンにより多極紡錘体は P5 の添加時のみレスキューされる
 (A) Cyp11a1 をノックダウンした細胞にトランスフェクション後から P5 を加えてインキュベーションした際の紡錘体極が多極化した細胞の割合
 (B) Cyp11a1 をノックダウンした細胞にトランスフェクション後から P4 を加えてインキュベーションした際の紡錘体極が多極化した細胞の割合
 (C) Cyp11a1 をノックダウンした細胞にトランスフェクション後から 17-OH-P5 を加えてインキュベーションした際の紡錘体極が多極化した細胞の割合
 (D) AG を 10 時間添加し固定 2 時間前に P5 を加えた際の多極化した紡錘体極をもつ細胞の割合

常な形態の維持に機能していることが示唆された。

P5 は centriole engagement を制御する

分裂期における紡錘体極の形態異常は中心体の複製異常や、centriole disengagement が早期に起こることが考えられる。そこで Cyp11a1 をノックダウンした分裂期の細胞の中心体を γ -tubulin, 中心小体を Centrin2 で染色し、細胞内と紡錘体極の中心小体の数についてそれぞれ検討を行った。正常な prometa/metaphase の細胞には PCM に囲まれた中心小体が二つあり、1つの

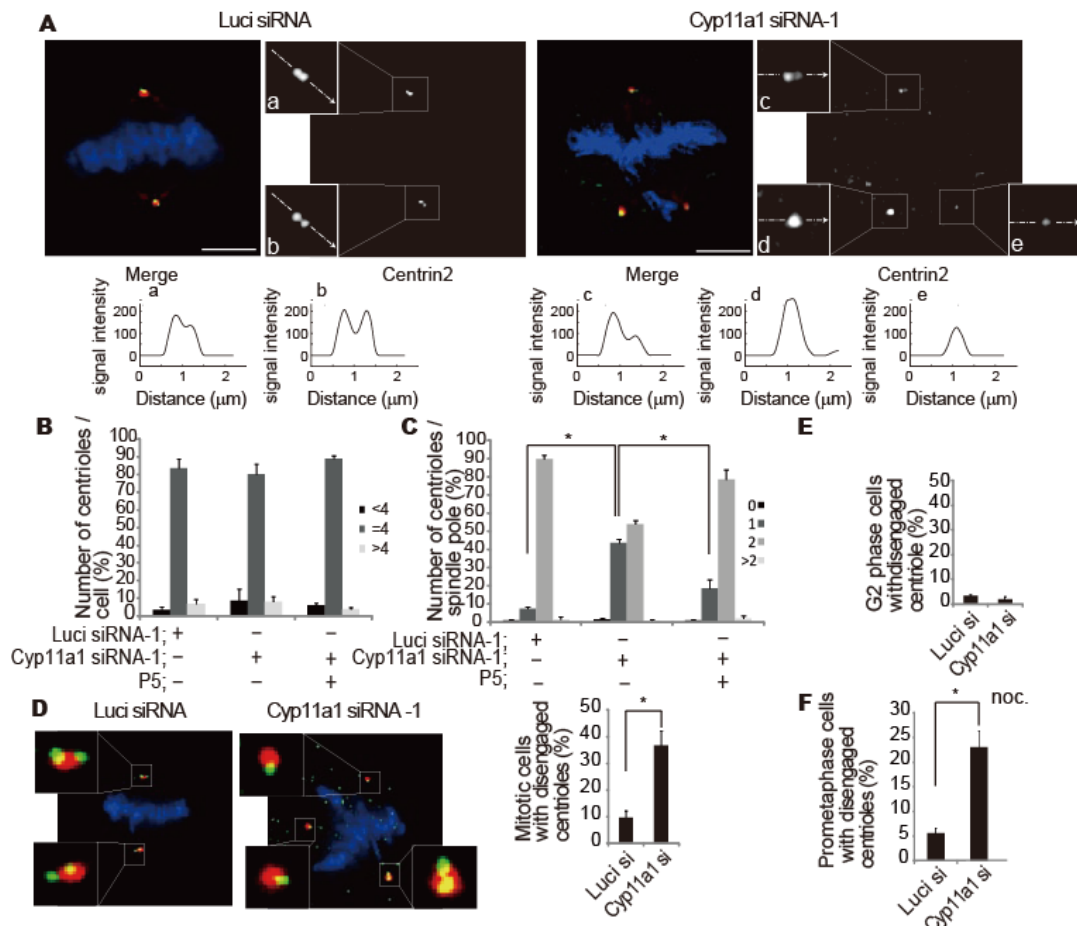


図 12 Cyp11a1 のノックダウンにより早期の中小体の解離が誘導される

(A) (上) Luciferase(Luci) と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし P5 を同調させた細胞の M 期の中心小体の染色像。赤；g-tubulin、緑；centrin2、青；Hoechst33342、scale bar=5mm (下) centrin2 のシグナルのピークをグラフ化した。

(B) (A) の条件での細胞あたりの中心小体数を定量化した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてグラフ化した $n>100$)

(C) (A) の条件での g-tubulin で染色した紡錘体極に局在する中心小体の数を定量化した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてダネットの多重比較を行った $n>100$, $*p<0.01$)

(D) (左) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし Cep135 により紡錘体極を染色した。赤；Cep135、緑；centrin、青；Hoechst33342、scale bar=5mm 相当；松村 (右) 解離した中小体をもつ細胞の割合を定量化した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n>100$ $*p<0.05$) 相当；松村

(E) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし G2 phase における中心小体の解離が起こっている細胞の割合を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてグラフ化した $n>100$)

(F) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし nocodazol (75ng/ml) を加えてインキュベーションした細胞の中心小体の解離が起こっている割合を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n>50$ $*p<0.01$) 相当；松村

細胞に4つ含まれている。コントロールの HeLa 細胞は1つの細胞に4つの中心小体が含まれていた(図 12A 左,B)。Cyp11a1 をノックダウンした細胞も同様に1つの細胞に含まれる中心体の数は4つであり、1細胞あたりの中心体の数は正常だった(図 12A 右,B)。つぎに、centriole engagement について検討した。コントロールの細胞は prometa/metaphase で、1つの紡錘体極にある中心小体が互いに接着しているため、1つの中心体に含まれる中心小体の数は2つである(図 12A 左、C)。しかし、Cyp11a1 をノックダウンした細胞は1つの中心小体しか含まれていないものが増加しており(図 12A 右,C)、prometa/meta phase で centriole disengagement が起こっていた。この傾向は、中心小体のマーカーである Cep135 による染色でも確認できた。(図 12 D)また、この早期の centriole disengagement は P5 の添加によりレスキューされた(図 12 C)。よって、P5 の欠失によりおこる紡錘体の多極化は、複製異常ではなく anaphase 以降で起こる centriole disengagement が早期に起こっていることが原因であることが分かった。また Cyp11a1 をノックダウンによる早期の centriole disengagement は G2 期では起こらなかった(図 12E)。従って P5 は prometa/meta phase における centriole engagement に必要であることが示された。

P5 による centriole engagement は Plk1 を介して起こる

複製が完了した中心体は prometa/meta phase で、接着タンパク質により繋がりとめられている。anaphase になると Separase の活性化により接着タンパク質が切断され、centriole disengagement が起こる(Mardinand Schiebel, 2012)。metaphase において、Separase は Securin と結合することにより活性が抑制されている(Cohen-Fixet al, 1996; Ciosk et al., 1998)。anaphase になると

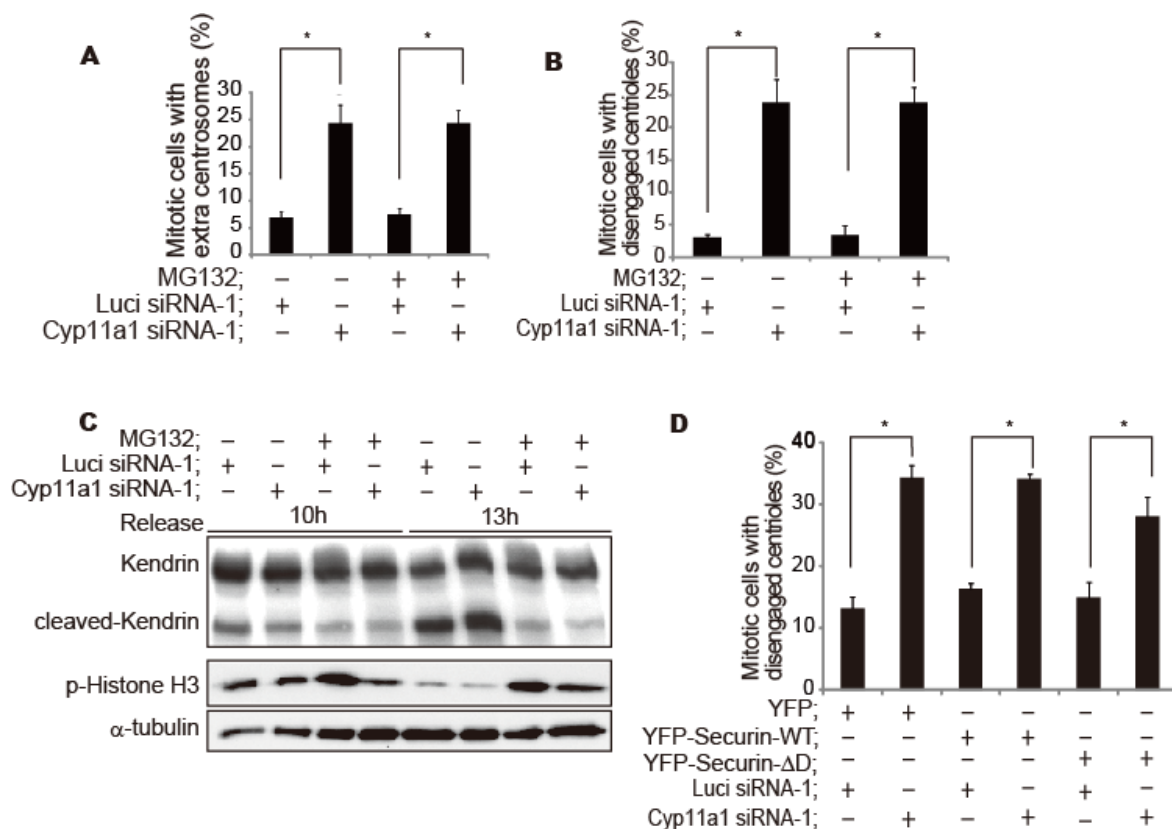


図 13 Cyp11a1 のノックダウンにより誘導される早期の中小体の解離は separase の異常な活性化ではない

(A) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし MG132 (5mM) を 2 時間加えて多極化した紡錘体極の細胞の割合をグラフ化した (mean ± s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った n>100 *p<0.01)

(B) (A) の条件で早期の中小体の解離が起こっている細胞の割合 (mean ± s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った n>100 *p<0.01)

(C) MG132 による Separase の活性化の抑制と細胞周期の停止を Kendrin,p-HistonH3 のウェスタンブロットにより確認した

(D) Luci と Cyp11a1 のノックダウンした細胞に、YFP,YFP-securin-WT,DD をトランスフェクションした細胞の中心小体の早期の解離が起こっている割合を定量化した 担当 ; 松村

APC によるユビキチン化で Securin は分解し、Separase は活性化する。早期の centriole disengagemen がおこる原因の一つに Separase の活性化の異常がある。プロテアソーム阻害剤である MG132 により Securin の分解を阻害し Separase の活性化を抑制し検討を行った。ダブルチミジンブロックで同調させ

た HeLa 細胞をリリース 10 時間後に MG132 を加えて、13h 後に Separase の基質である Kendrin の切断に変化が見られるか検討した。コントロールでは anaphase において活性化した Separase により Kendrin が切断されるため、断片が検出された。しかし、MG132 を加えると Kendrin の断片が見られなくなった。これより、Separase の活性化が MG132 の添加により抑制されていることが示された(図 13C)。また M 期のマーカーである Ser10-リン酸化 Histone H3 のウェスタンブロットを行うと、リリース 13 時間後でも分裂期で停止していた(図 13C)。そこで、同様の条件を用いて Separase の活性を抑制し、P5 の欠失による紡錘体極の形態変化を観察した。その結果、MG132 を加えても Cyp11a1 のノックダウンによる紡錘体極の多極化や(図 13A)centriole disengagement が起こることが分かった(図 13B)。また、Kendrin の切断は、Cyp11a1 をノックダウンしても早期の Separase の活性化による切断は起こっていなかった(図 13C,10h)。FACS で PI 染色した細胞を解析しても Cyp11a1 のノックダウンによる細胞周期の異常な進行は見られなかった(図 15)。さらに nocodazol で細胞周期を prometaphase に停止させても Cyp11a1 のノックダウンによる早期の centriole disengagement の誘導に変化が見られなかった(図 12F)。つぎに、Cyp11a1 のノックダウンした細胞にプロテアソームによる分解を受けない Securin の変異体(YFP-Securin- Δ D)を発現させて検討を行った (Hagting et al., 2002)が、Cyp11a1 のノックダウンによる早期の centriole disengagement は抑制されなかった(図 13D)。従って、P5 の欠失による中心小体の早期の centriole disengagement は Separase の異常な活性化によるものではないことが分かった。anaphase で Separase による接着タンパク質の切断が起こる前に Plk1 は prophase pathway において、接着タンパク質をリン酸化し、中心体から解離させて centriole disengagement を誘導する (Tsou et al., 2009;

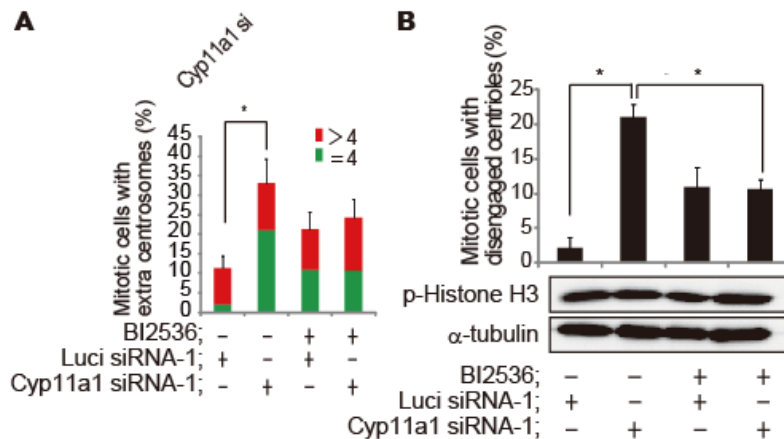


図 14 Cyp11a1 のノックダウンにより誘導される早期の中小体の解離は Plk1 の阻害により抑制される

(A) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし BI2536 (100nM) を 2 時間加えて多極化した紡錘体極の細胞の割合をグラフ化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n > 100$ * $p < 0.05$)

(B) (A) の条件で早期の中小体の解離が起こっている細胞の割合 (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n > 100$ * $p < 0.025$)

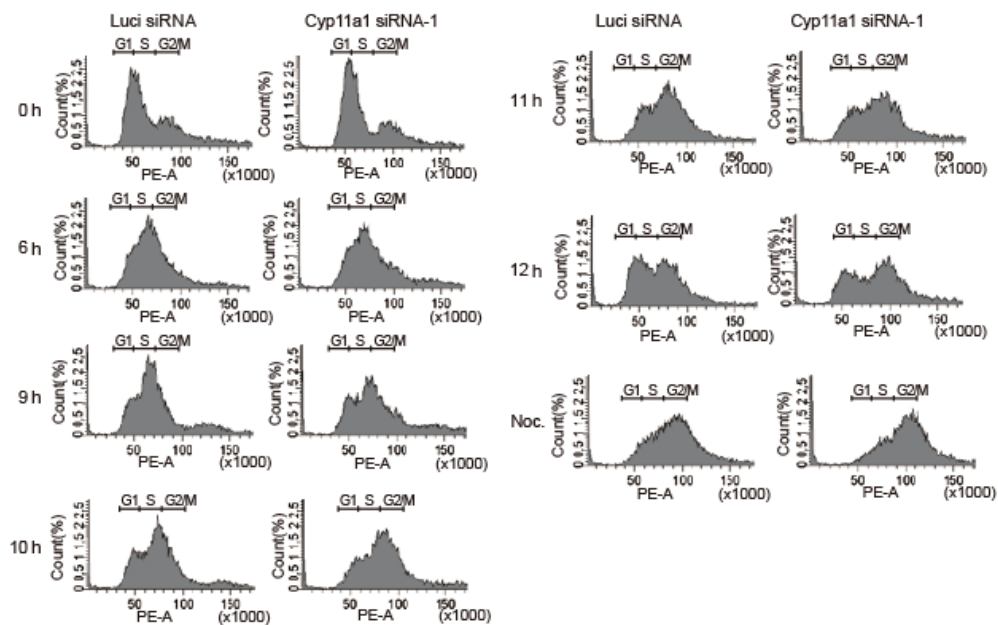


図 15 Cyp11a1 をノックダウンしても細胞周期の進行に変化はない

Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションしダブルチミジンプロックで細胞を同調させリリース後経時的に細胞を回収して FACS による解析を行った。nocodazol (75ng/ml) は添加後 1 時間インキュベーションした。

Schockel et al., 2011)。そこで BI2536 により Plk1 の活性を阻害して、Cyp11a1 のノックダウンによる早期の centriole disengagement に変化が見られるか検討した。Plk1 の阻害により、P5 の欠失による多極紡錘体の増加は部分的にレスキューされた(図 14A)。さらに centriole disengagement について検討すると BI2536 の添加により明らかにレスキューされていることが判明した(図 14B)。よって P5 による centriole engagement は prophase pathway に関連することが示唆された。

P5 は sSgo1 の紡錘体極への局在化を制御する

Shugoshin1 (Sgo1)は prophase pathway おいて、Plk1 による Cohesin のリン酸化を阻害することで、セントロメアに局在する Cohesin を解離から保護し、姉妹染色体の接着を維持する (Watanabe and Kitajima, 2005)。中心体においても、metaphase で二つの中心小体は接着タンパク質により繋ぎとめられ engagement が維持されているが、近年、Sgo1 の splice variant である short-Shugoshin (sSgo1) が紡錘体極に局在し、centriole engagement を維持することが報告された(Wang et al., 2008)(図 16A)。P5 が prophase pathway での中心小体の接着に関わることから、次に、P5 が sSgo1 を制御する可能性について検討した。sSgo1/Sgo1 両方に反応する抗体を用いて染色したところ、sSgo1/Sgo1 の紡錘体極とキネトコア局在が認められた(図 16A)。sSgo1/Sgo1 共通の配列のオリゴにより RNAi を行うと紡錘体極とキネトコアのシグナルが減弱していた(図 16A,B)ことから、この抗体が sSgo1 と Sgo1 を認識していることが示された。そこで、P5 による機能について検討した。Cyp11a1 をノ

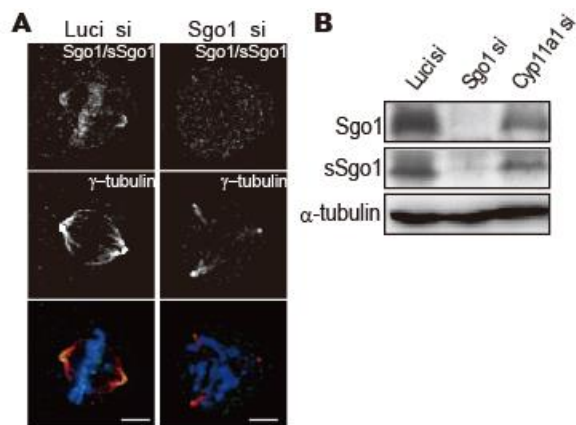


図 16 分裂期の紡錘体極における sSgo1 の局在

(A) Luci と Sgo1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし Sgo1 により紡錘体極を染色した。赤 ; γ -tubulin、緑 ; Sgo1/sSgo1、青 ; Hoechst33342
(B) (A) における Sgo1/sSgo1 の発現抑制をウェスタンブロットで確認した

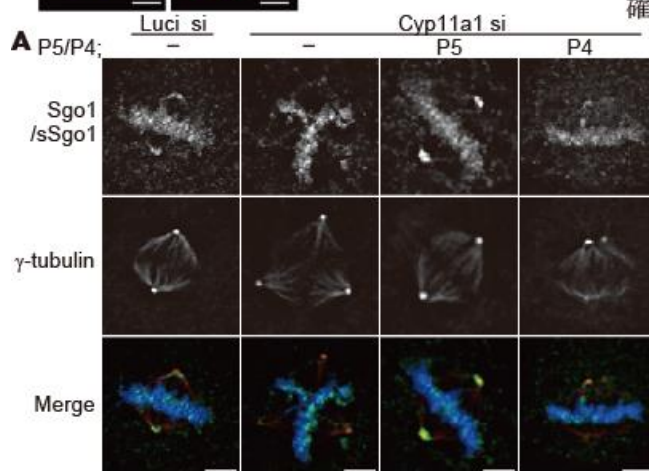
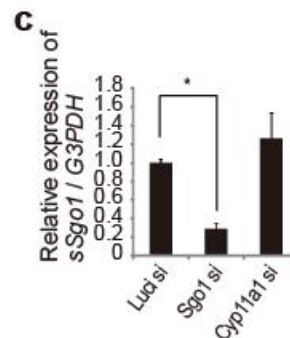
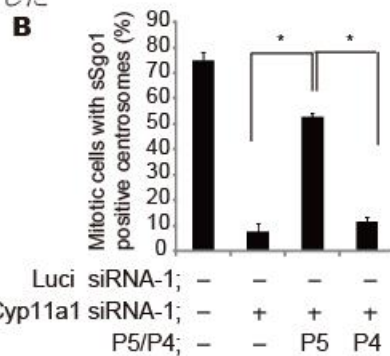


図 17 P5 は sSgo1 を紡錘体へ局在させる

(A) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし Sgo1 で細胞染色した。赤 ; γ -tubulin、緑 ; Sgo1/sSgo1、青 ; Hoechst33342
(B) (A) に Sgo1/sSgo1 が紡錘体極に局在する細胞の割合を定量化した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてダネットの多重比較を行った $n > 200$ * $p < 0.01$)
(C) Luci、Sgo1/sSgo1、Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションした細胞を q-PCR により sSgo1 の発現量を確認した。グラフは G3PDH で補正し Luci と比較した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った * $p < 0.01$)



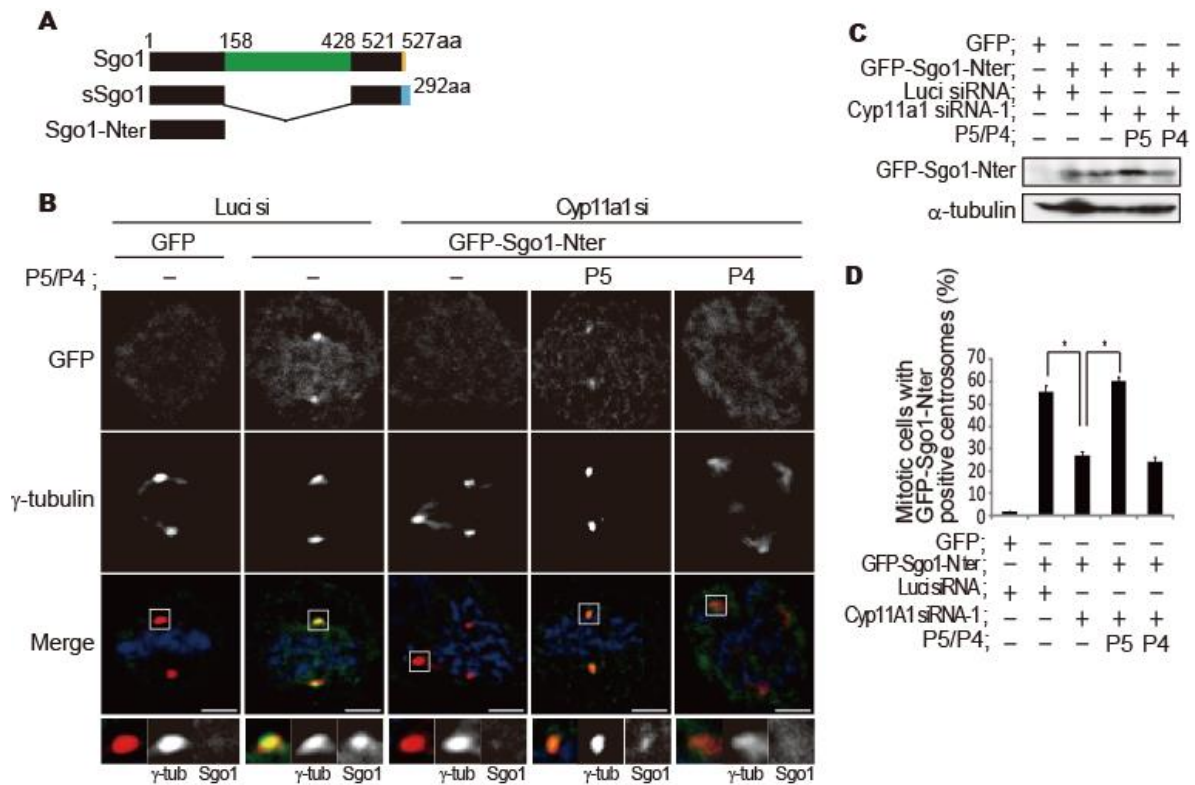


図 18 P5 は Sgo1-Nter を紡錘体へ局在させる

(A) Sgo1、sSgo1、Sgo1-Nter の略図。Sgo1-Nter は Sgo1、sSgo1 の N 末端の 1-158 アミノ酸残基の共通領域である。

(B) Luci と Cyp11a1 のノックダウンした細胞に、GFP、GFP-Sgo1-Nter をトランスフェクションし GFP で細胞染色した。赤； γ -tubulin、緑；GFP、青；Hoechst33342 担当；松村

(C) (B) における GFP、GFP-Sgo1-Nter の発現をウェスタンブロットにより確認した

(D) (B) における GFP-Sgo1-Nter が紡錘体極に局在する細胞の割合を定量化した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてダネットの多重比較を行った $n > 200$ * $p < 0.01$)

ックダウンすると sSgo1/Sgo1 のキネトコアへの局在は正常であるのに対して、紡錘体には局在できなくなっていた。(図 17A,B)この異常は P4 を添加しても変化しないが、P5 を添加するとレスキューした(図 17A、B)。sSgo1/Sgo1 の共通配列である N 末端は、強制発現させると紡錘体極に局在することが報告されている(Wang et al., 2008)。そこで、N 末端側 1-158 アミノ酸残基を GFP に融合させたコンストラクト(GFP-Sgo1-Nter)を作成し(図 18A)、局在を確認したところ、GFP-Sgo1-Nter はコントロール細胞内で紡錘体極に局在することが認

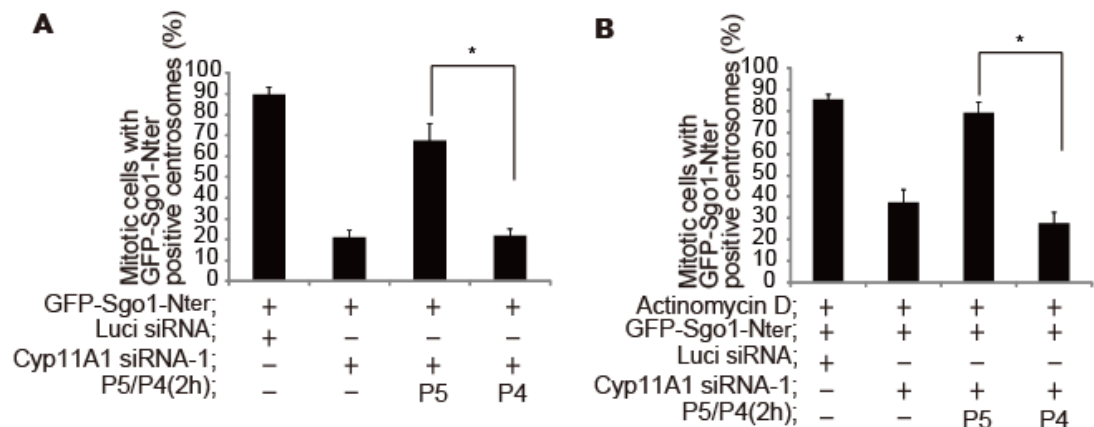


図 19 P5 は転写を介さずに Sgo1-Nter を紡錘体へ局在させる

(A) Luci と Cyp11a1 のノックダウンした細胞に、GFP- Sgo1-Nter をトランスフェクションし P5 を 2h 添加した。GFP- Sgo1-Nter が紡錘体極に局在する細胞の割合を定量化した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n>50$ * $p<0.01$)

(B) (A) の条件にさらに actinomycinD により転写を阻害した。GFP- Sgo1-Nter が紡錘体極に局在する細胞の割合を定量化した。(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った $n>50$ * $p<0.01$)

められた。しかし、Cyp11a1 をノックダウンすると紡錘体極に局在できなくなった。また、この異常は P5 を添加するとレスキューされた(図 18B,D)。また、GFP-Sgo1-Nter を発現させた細胞からショ糖密度勾配遠心により中心体を精製すると、コントロールの細胞の中心体は γ -tubulin で示される中心体画分に GFP-Sgo1-Nter が含まれていたが、AG により P5 が欠失した細胞の中心体画分では、GFP-Sgo1-Nter のタンパク量が減少していた(図 20A)。さらに、中心体精製時に細胞抽出液から脂質を取り除いた際も同様に、中心体画分の GFP-Sgo1-Nter タンパク量が減少していた(図 20B)。ステロイド化合物は遺伝子発現の誘導に深く関わっていることからこの現象が転写を介していることが考えられる。しかしウエスタンブロットと qPCR により sSgo1 発現量の変化を検討したところ、Cyp11a1 をノックダウンしても sSgo1 の RNA 発現量 sSgo1、GFP-Sgo1-Nter のタンパク質量はコントロールと変わらなかった(図

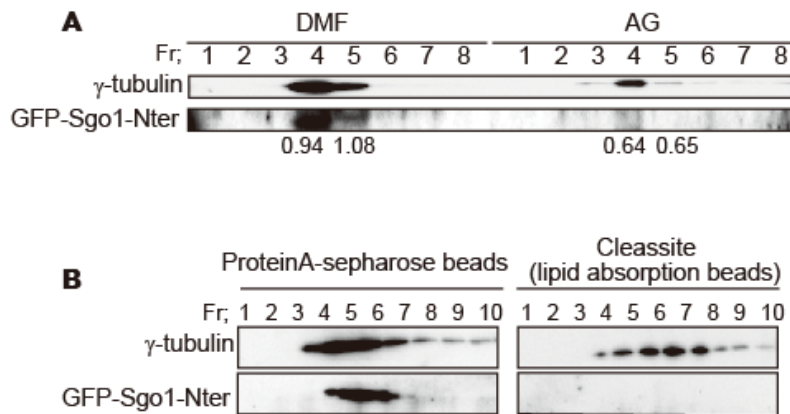


図 20 P5 の枯渇や脂質の除去により Sgo1-Nter のタンパク質量が中心体から減少した
 (A) GFP-Sgo1-Nter が発現している細胞に AG (100mM) を加えて nocodazol により細胞周期を同調させ、分裂期の細胞の中心体を精製した。 γ -tubulin と GFP のウェスタンブロットにより中心体が含まれる画分と Sgo1-Nter を確認した。数値は γ -tubulin で補正した Sgo1-Nter の割合
 (B) GFP-Sgo1-Nter が発現している細胞を nocodazol により細胞周期を同調させ、ビーズ (Cleassite) により脂質を除去し分裂期の細胞の中心体を精製した。 γ -tubulin と GFP のウェスタンブロットにより中心体が含まれる画分と Sgo1-Nter を確認した。

16B,17C,18C)。また、Cyp11a1 をノックダウンした細胞に P5 添加後、インキュベーションする時間を短縮(2 時間)しても GFP-Sgo1-Nter の紡錘体極への局在化はレスキューされた(図 19A)。さらに ActinomycinD により転写を阻害した条件下でも、Cyp11a1 をノックダウンすると GFP-Sgo1-Nter の中心体局在が減弱し、P5 添加によりレスキューした(図 19B)このことから、P5 による sSgo1 の紡錘体への局在化は転写を介さずに起こっていると考えられる。

P5 は sSgo1 と直接結合する

P5 の欠失による早期の centriole disengagement は G2 期では起こらず M 期で見られるようになる(図 12E)。また、この現象は転写を介していない(図 16B,17C,18C,19A,B)ことから、P5 は何らかの標的タンパク質と結合してノンゲノミックに機能していることが考えられる。最近、微小管プラス端集積因子

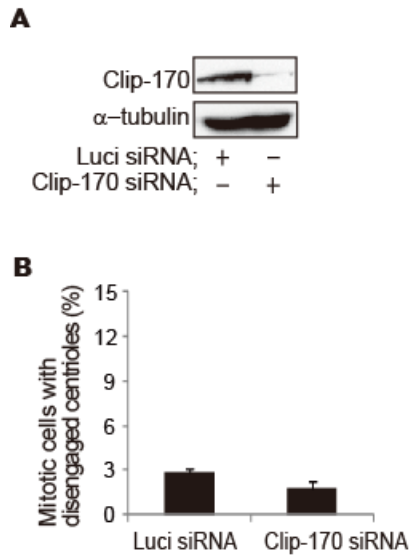


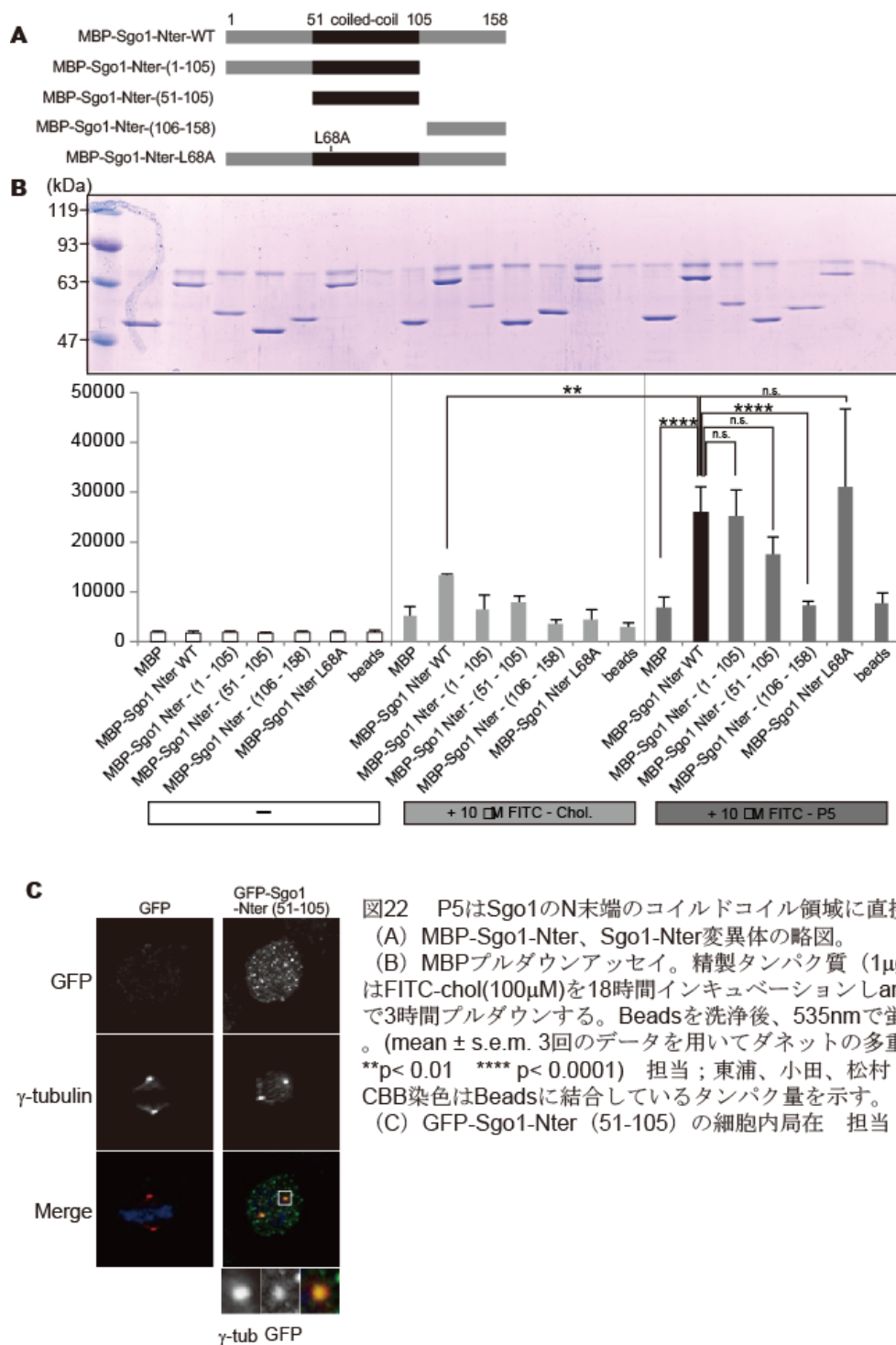
図 21 Clip-170 は紡錘体極の機能には関与しない

(A) HeLa 細胞に Luciferase(Luci) と Clip-170 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし M 期に同調させた細胞の Cyp11a1 の発現をウェスタンブロットにより確認した。

(B) (A) の条件下による中心小体の早期の解離が起こっている細胞の割合を定量化した。

(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてグラフ化した $n > 100$)

の CLIP-170 が P5 と直接結合し微小管の伸長に関わることが報告された (Weng et al., 2013)。CLIP-170 が P5 による中心小体の接着に関わっている可能性が考えられたが、CLIP-170 をノックダウンしても早期の centriole disengagement は起こらなかった(図 21A,B)。そこで、次に、脂質を取り除くと GFP-Sgo1-Nter が中心体画分に留まれなくなる(図 20B)ことから、P5 が sSgo1 に直接結合している可能性を検討した。MBP でラベルされたタンパク質を精製し(図 22A)、コントロールの MBP、MBP-Sgo1-Nter 精製タンパク質を FITC-P5 または FITC-chol とともにインキュベーションし、アミロースビーズでプルダウンしたのち FITC の蛍光シグナルを測定した。MBP-Sgo1-Nter と FITC-P5 をインキュベーションすると、FITC-chol よりも強いシグナルを示した(図 22B)。そこで Sgo1-Nter との結合領域をより詳細に検討するため、コイルドコイル領域に注目し、さらに断片化した変異体を作成して(図 22A)同様の実験を行った。その結果、FITC-P5 はコイルドコイル領域が含まれる Sgo1-Nter(51—105)と結合した(図 22B)。同じ領域の GFP プラスミドをコンストラクトし、細胞内の局在を確認すると、紡錘体極に局在化していた(図 22C)。従って、P5 はターゲットの sSgo1 の N 末端のコイルドコイル領域と直接結合し、この部分



が紡錘体極への局在に十分であることが分かった。PP2A と Sgo1-Nter により形成される複合体の結晶構造解析により、Sgo1-Nter はコイルドコイル領域で二量体を形成し、PP2A と結合することが報告されている(Xu et al., 2009)。同

様のメカニズムが P5 との結合に機能することも考えられるため、二量体を形成できない変異体 Sgo1-Nter-L68A を作成し検討を行った。HeLa 細胞に Flag-Sgo1-Nter-WT と GFP-Sgo1-Nter-WT または GFP-Sgo1-Nter-L68A を共発現させると、GFP-Sgo1-Nter-WT は Flag-Sgo1-Nter-WT と共役沈降したが GFP-Sgo1-Nter-L68A は共役沈降しなかった。さらに、この変異体は紡錘体極に局在できなかった(図 24A,B)。そこで、Sgo1-Nter-L68A と FITC-P5 の結合を検討したが、結合能は維持したままであった(図 22B)。さらに、Cyp11a1 をノックダウンし Sgo1-Nter-WT の二量体の形成に変化が見られるか検討したが、細胞内の P5 が減少しても二量体の形成には変化がなかった(図 25)。従って、Sgo1-Nter が P5 と結合するためには二量体であることが必須ではないことが示唆された。

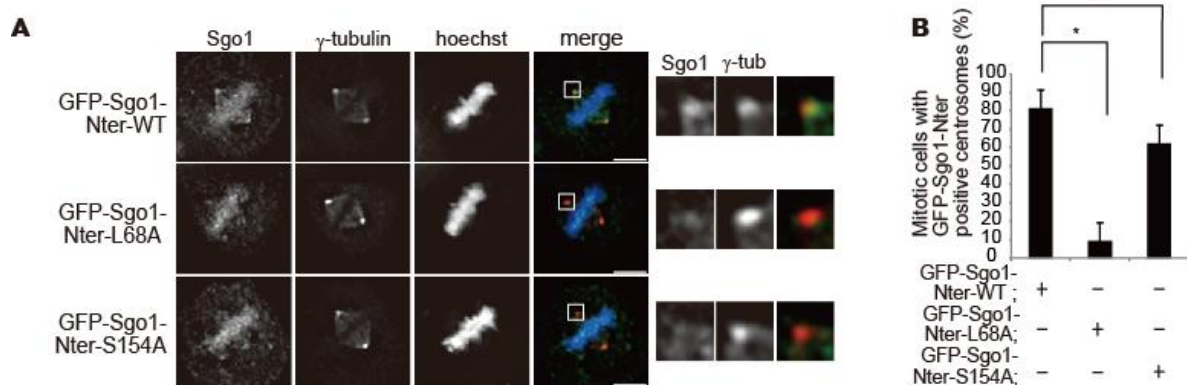


図 24 Sgo1-Nter の紡錘体極への局在には二量体の形成や Plk1 によるリン酸化が必要である
 (A) GFP-Sgo1-Nter-WT、L68A、S154A をトランスフェクションし GFP で細胞染色した。赤; γ -tubulin、緑; GFP、青; Hoechst33342 担当; 松村
 (B) (A) の条件のもとで、GFP のシグナルが紡錘体極に見られる細胞の割合を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてダネットの多重比較を行った $n > 200$ * $p < 0.01$)

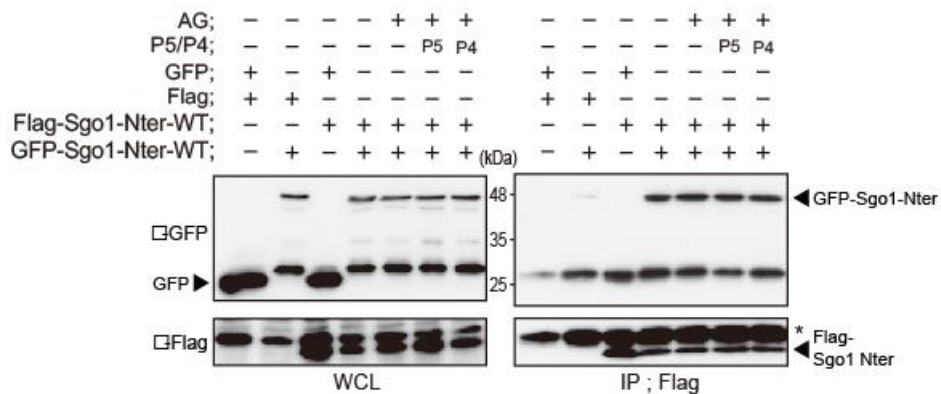


図 25 P5 は Sgo1-Nter の二量体の形成に必須ではない

GFP-Sgo1-NterWT と Flag-Sgo1-NterWT を共発現させた細胞に AG と P5 または P4 を添加し Flag 抗体で免沈したのちウェスタンブロットにより共沈物を確認した。

Plk1 は Sgo1-Nter(Ser154)をリン酸化する

sSgo1 が紡錘体極へ局在するためには Plk1 による sSgo1 のリン酸化が必要である(Wang et al., 2008)。そこで BI2536 を添加し Plk1 の活性を阻害して sSgo1 の局在を確認すると、予想通り、sSgo1 は紡錘体極に局在できなくなった(図 27A,B)。一方、Cyp11a1 をノックダウンした細胞では、Plk1 の紡錘体極への局在に変化はなかった(図 26A,B)。また、AuroraA、Pericentrin、 γ -tubulin の紡錘体極を構成しているタンパク質についても局在に変化は見られなかった(図 26AC)。次に、P5 が Plk1 による sSgo1 のリン酸化について関与している可能性を検討した。以前の報告では、Plk1 のリン酸化サイトの候補として

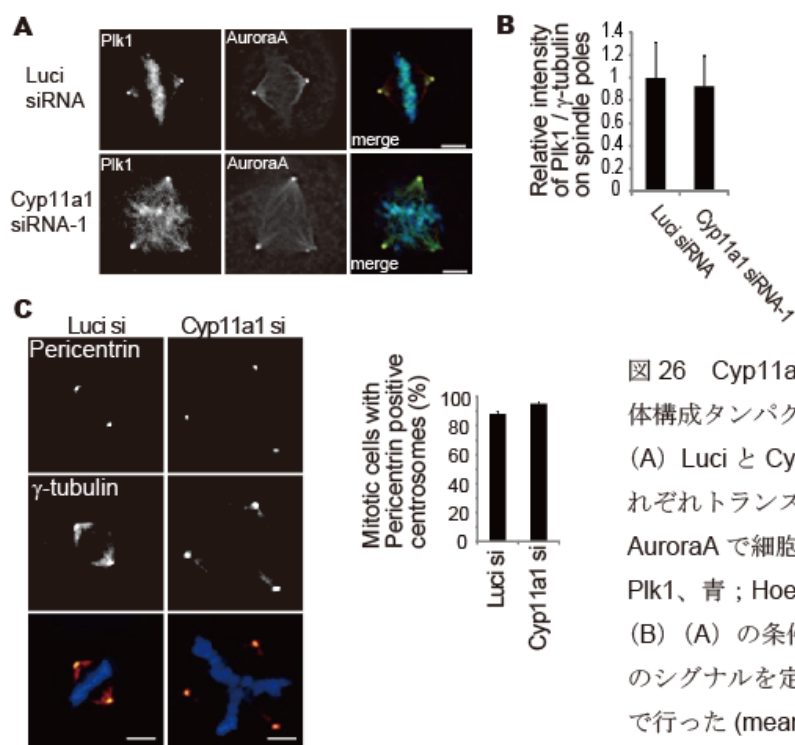


図 26 Cyp11a1 をノックダウンしても中心体構成タンパク質の局在に変化はない。

(A) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし Plk1、AuroraA で細胞染色した。赤 ; AuroraA、緑 ; Plk1、青 ; Hoechst33342

(B) (A) の条件下における紡錘体極の Plk1 のシグナルを定量化した。補正は γ -tubulin で行った (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いてグラフ化した n>20)

(C) Luci と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし pericentrin で細胞染色した。赤 ; γ -tubulin、緑 ; pericentrin、青 ; Hoechst33342

(D) (C) の条件下における pericentrin 陽性の紡錘体極をもつ細胞の割合を定量化した。

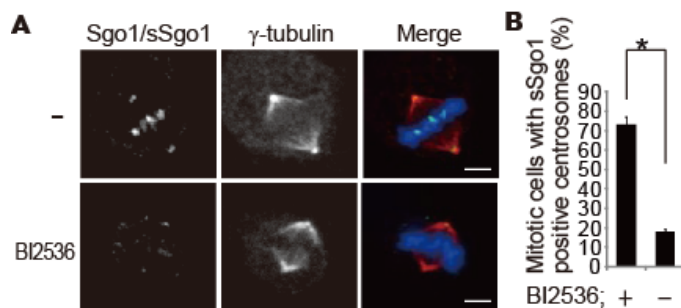


図 27 sSgo1 は Plk1 によりリン酸化され紡錘体に局在する

(A) ダブルチミジンブロックにより同調させた細胞に BI2536 (100nM) を 1 時間添加し

Sgo1/sSgo1 で細胞染色した。赤 ; γ -tubulin、緑 ; Sgo1/sSgo1、青 ; Hoechst33342

(B) (A) の条件下における Sgo1/sSgo1 陽性の紡錘体極をもつ細胞の割合を定量化した。

(mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて t 検定を行った n>100 *p< 0.01)

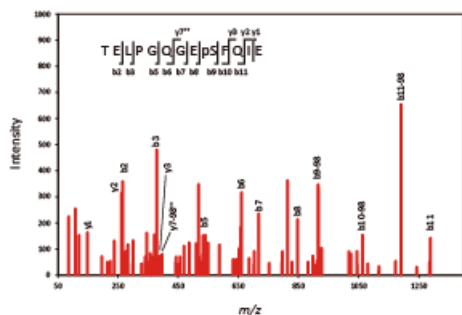


図 28 Plk1 による Sgo1-Nter のリン酸化部位の同定
GST-Sgo1-Nter と Plk1 の混合物に ATP と MgCl₂ を加えてリン酸化プロテオーム解析を行った。担当；石濱、佐藤、高橋

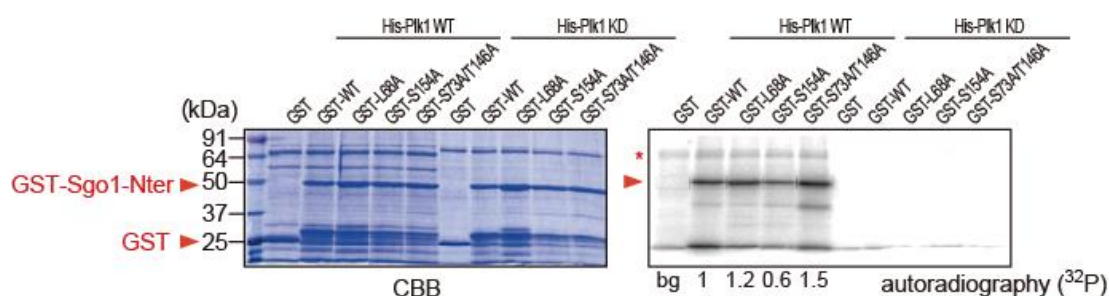


図 29 Plk1 により Sgo1-Nter の Ser154 がリン酸化される

His-Plk1-WT または His-Plk1-KD により GST-Sgo1-Nter-WT、L68A,S154A、S73A/T146A の in vitro kinase assay を行いサンプル処理後オートラジオグラフィーにより検出した。GST-Sgo1-Nter-WT のシグナルにより補正し、数値化した。担当；豊島

sSgo1 の Ser73 と Thr146 が挙げられている(Wang et al., 2008)が、直接のリン酸化であるかどうかの検討がなされていなかった。そこで、それぞれ Ala に変えた変異体のタンパク質を精製し in vitro kinase assay を行ったところ、予想外にもこれらの領域に変異を加えても Plk1 によるリン酸化は抑制されなかった(図 29)。そこで、nano LC-MS/MS により詳細なリン酸化プロテオーム解析を行い確認したところ、Ser73 と Thr146 にリン酸化のシグナルは見られなかったが Ser154 にシグナルのピークがあることが分かった(図 28)。そこで Ser154 を Ala に変えた変異体のタンパク質で in vitro kinase assay を行くと Plk1 によるリン酸化が抑制された(図 29)。さらに GFP-Sgo1-Nte-S154A を細胞内に発現させ局在を確認すると、紡錘体極への局在化が減少していた(図 24A,B)。しかし、Plk1 による sSgo1 のリン酸化は cyp11a1 のノックダウンや P5 の添加に

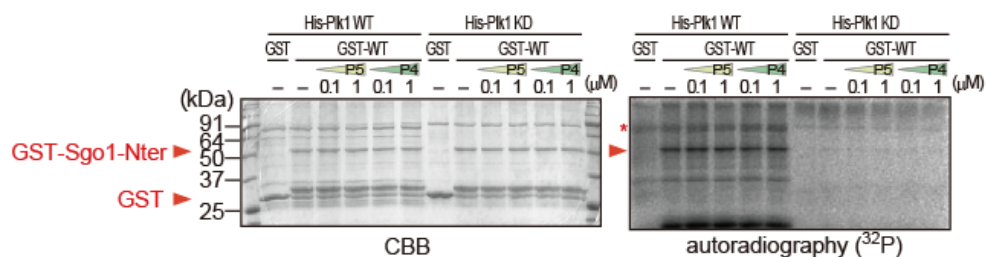


図 30 Plk1 による Sgo1-Nter のリン酸化は P5 の添加により変化しない

His-Plk1-WT または His-Plk1-KD により GST-Sgo1-Nter-WT、L68A,S154A、S73A/T146A の in vitro kinase assay を行いサンプル処理後オートラジオグラフィーにより検出した。GST-Sgo1-Nter-WT のシグナルにより補正し、数値化した。担当；豊島

よる変化は見られなかった(図 30)。また L68A も同様にリン酸化について変化はなかった(図 29)。従って sSgo1 の二量体形成や P5 と sSgo1 の結合には Plk1 による sSgo1 リン酸化には関与していないと考えられる。

P5 による sSgo1 の制御機構が機能している細胞株の検討

P5 による sSgo1 を介した紡錘体極の制御機構が HeLa 細胞以外の細胞でも存在しているのかを検証するために、HEK293T 細胞、A549 細胞で検討を行った。HEK293T 細胞、A549 細胞はそれぞれ Cyp11a1 が発現しており、ノックダウンにより発現抑制が確認できた (図 31A,32A)。HEK293T 細胞は Cyp11a1 をノックダウンしても紡錘体極の多極化は起こらなかった (図 31B)。また、GFP-Sgo1-Nter を発現させても HeLa 細胞で見られていたような紡錘体極でのシグナルが HEK293T 細胞には見られなかった(図 31C)。A549 細胞は Cyp11a1 のノックダウンにより紡錘体極の多極化が起こった(図 32B)。また、GFP-Sgo1-Nter の紡錘体への局在化を検討すると、コントロールの細胞は紡錘体極に局在するが、Cyp11a1 をノックダウンすると紡錘体極に留まることができなくなった(図 32C)。従って、P5 による sSgo1 を介した紡錘体極の制御は、細胞の種類によって異なることが示唆された。

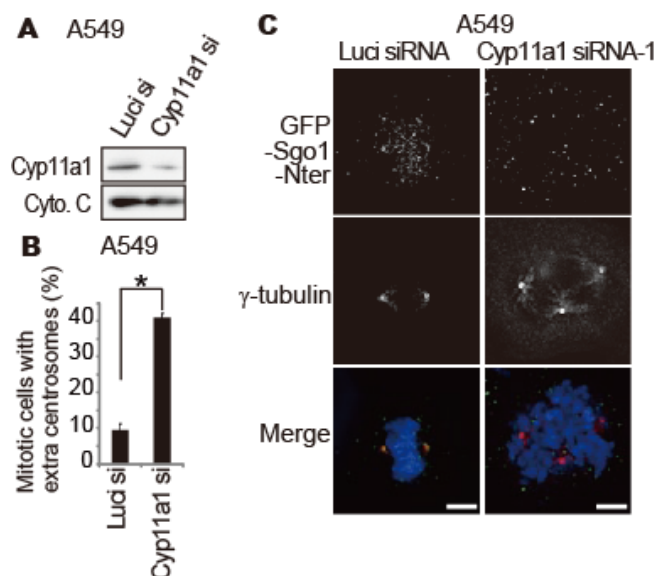


図 32 A549 細胞は P5 を介した sSgo1 による紡錘体極のメカニズムが機能している。

(A) A549 細胞に Luciferase(Luci) と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし M 期に同調させた細胞の Cyp11a1 の発現をウェスタンブロットにより確認した

(B) (A) の条件下で紡錘体が多極化した細胞の割合を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて定量化した $n>50$ * $p<0.01$)

(C) Luci と Cyp11a1 のノックダウンした細胞に、GFP- Sgo1-Nter をトランスフェクションし抗 GFP 抗体で染色した。

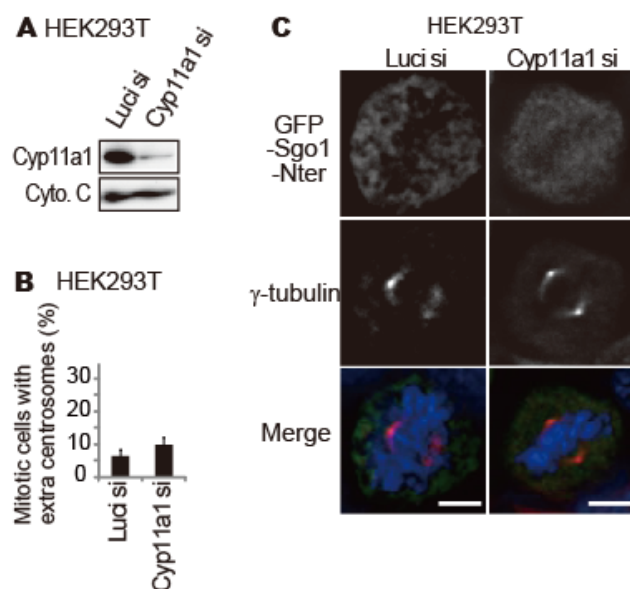


図 31 HEK293T 細胞は P5 を介した sSgo1 による紡錘体極のメカニズムが機能していない。

(A) HEK293T 細胞に Luciferase(Luci) と Cyp11a1 の siRNA オリゴをそれぞれトランスフェクションし M 期に同調させた細胞の Cyp11a1 の発現をウェスタンブロットにより確認した

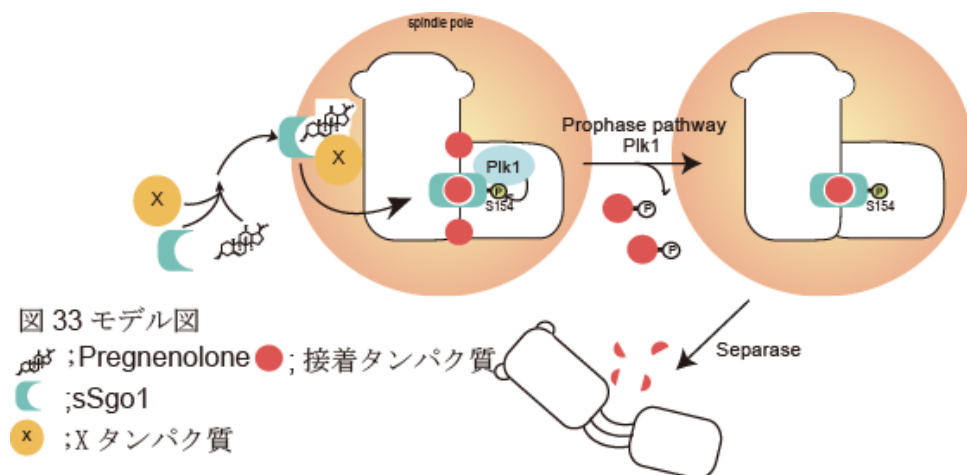
(B) (A) の条件下で紡錘体が多極化した細胞の割合を定量化した (mean \pm s.e.m. 3 回のデータを用いて定量化した $n>70$)

(C) Luci と Cyp11a1 のノックダウンした細胞に、GFP- Sgo1-Nter をトランスフェクションし抗 GFP 抗体で染色した。

第 4 章

考察

本研究で、P5 は分裂期において sSgo1 を紡錘体極に局在化し、centriole engagement を維持していることを明らかにした。この現象は、遺伝子発現を介さずに、P5 は直接 sSgo1 のコイルドコイル領域(51—105 アミノ酸残基)と結合することにより、その機能を発揮していることが分かった。セントロメアでの Sgo1 の二量体化は PP2A との複合体形成に必要であるが、P5 との結合には関連しなかった。しかし、二量体を形成しない Sgo1-Nter は紡錘体極に留まれない (図 24A)。sSgo1 の二量体化や Plk1 による Ser154 のリン酸化が、sSgo1 と中心体に局在する接着タンパク質との結合を促進し、sSgo1 が紡錘体極に留まりやすくなることで中心小体の接着を強めることが考えられる(図 33)。P5 は sSgo1 のリン酸化には直接関わらなかったが、P5 が欠失すると sSgo1 は紡錘体極に局在化できなくなる。P5 は sSgo1 を紡錘体極に局在化させるために、ほかのタンパク質と複合体を形成することが示唆される(図 33)。BI2536 により Plk1 の活性を阻害すると sSgo1 の Ser154 がリン酸化されなくなるため sSgo1 は紡錘体極に留まれないが、Plk1 の活性阻害は同時に接着タンパク質のリン酸化も阻害するためこれらのタンパク質の centrosome からの解離を抑制し、



centriole engagement が維持される。Cyp11a1 のノックダウンにより P5 を欠失させ、Plk1 の活性を阻害すると早期の centriole disengagement が抑制された。これより P5 による早期の centriole disengagement は、中心小体の接着タンパク質の紡錘体極への局在化の不全ではないと考えられる。Cyp11a1 のノックアウトマウスは、胎児期は母親由来のステロイドホルモンが供給され正常に生まれるが自ら合成できないため、脱水が原因で生後致死してしまう。しかし、このマウスは鉱質コルチコイドを投与すると成体まで成長することができる。この条件下で、Pregnenolone の産生は依然抑制されているため、このマウスの体内の Pregnenolone 量は低いと考えられる。従って、Pregnenolone による中心体制御は、正常の生体組織では多くの場合機能していないと考えられる。このことは、非がん細胞の HEK293 細胞では P5 による中心小体制御機能が働いていないこととも一致する(図 31)。また、P5 の濃度は細胞周期の進行によって変動し、分裂期にピークを迎え紡錘体極に局在している。さらに、P5 の欠失による中心小体の早期の解離は G2 期では起こらず M 期以降でみられる現象である。よって、P5 はがん細胞などの増殖能をもつ細胞の分裂期で特異的に機能し、細胞増殖を補助していることが考えられる。このことから、このメカニズムの詳細な説明はがんの治療薬への応用につながると期待できる。

参考文献

Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 451-463.

Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 25-34.

Cabral, G., Sans, S.S., Cowan, C.R., and Dammermann, A. (2013). Multiple mechanisms contribute to centriole separation in *C. elegans*. *Curr. Biol.* *23*, 1380-1387.

Cato AC1, Nestl A, Mink S.(2002)Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*. 138 re9.

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* *93*, 1067-1076.

Chen, H.W., Kandutsch, A.A., and Waymouth, C. (1974). Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature* *251*, 419-421.

Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., and Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* *10*, 3081-3093.

Edwards, D.P. (2000). The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* *5*, 307-324.

Fernandez, C., Lobo, Md Mdel V., Gomez-Coronado, D., and Lasuncion, M.A. (2004). Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Exp. Cell Res.* *300*, 109-120.

Fukasawa, K. (2007). Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 911-924.

Graves, P. E., and Salhanick, H. A. (1979). Stereoselective inhibition of aromatase by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology* *105*, 52-57.

Grigoryev, D. N., Long, B. J., Njar, V. C., and Brodie, A. H. (2000). Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth via the mutated androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *75*, 1-10.

Hagting, A, Den Elzen, N, Vodermaier, H.C., Waizenegger, I.C., Peters, J.M., and Pines, J. (2002) Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J. Cell Biol.* *157*, 1125-1137.

Hauffa, B., and Hiort, O. (2011). P450 side-chain cleavage deficiency--a rare cause of congenital adrenal hyperplasia. *Endocr. Dev.* *20*, 54-62.

Hsu, H.J., Liang, M.R., Chen, C.T., and Chung, B.C. (2006). Pregnenolone stabilizes microtubules and promotes zebrafish embryonic cell movement. *Nature* *439*, 480-483.

Hu, M.C., Hsu, N.C., El, Hadj N.B., Pai, C.I., Chu, H.P., Wang, C.K., and Chung, B.C. (2002). Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1. *Mol. Endocrinol.* *16*, 1943-1950.

Hut, H.M., Lemstra, W., Blaauw, E.H., Van, Cappellen G.W., Kampinga, H.H., and Sibon, O.C. (2003). Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1993-2004.

Keryer, G., Ris, H., and Borisy, G.G. (1984). Centriole distribution during tripolar mitosis in Chinese hamster ovary cells. *J. Cell. Biol.* *98*, 2222-2229.

Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* *441*, 46-52.

Kuriyama, R., and Borisy, G.G. (1981). Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J. Cell Biol.* *91*, 814-821.

Lavoie, H.A., and King, S.R. (2009). Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp. Biol. Med.* *234*, 880-907.

Lee, K., and Rhee, K. (2012). Separase-dependent cleavage of pericentrin B is necessary and sufficient for centriole disengagement during mitosis. *Cell Cycle* *11*, 2476-2485.

Mardin, B.R., and Schiebel, E. (2012). Breaking the ties that bind: new advances in centrosome biology. *J. Cell Biol.* *197*, 11-18.

Matsuo, K., Ohsumi, K., Iwabuchi, M., Kawamata, T., Ono, Y., and Takahashi, M. (2012). Kendrin is a novel substrate for separase involved in the licensing of centriole duplication. *Curr. Biol.* *22*, 915-921.

McKenna, T. J., and Brown, R. D. (1974). Pregnenolone in man: plasma levels in states of normal and abnormal steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* *38*, 480-485.

Millar, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* *9*, 295-318.

Mizota, K., and Ueda, H. (2008). N-terminus of MAP2C as a neurosteroid-binding site. *Neuroreport* *19*, 1529-1533.

Moudjou, M., and Bornens, M. (1994). Isolation of centrosomes from cultured animal cells. *Cell Biology: A Laboratory Handbook* (ed. J. E. Celis), 595-604, Academic Press.

Murakami, K., Fellous, A., Baulieu, E.E., and Robel, P. (2000). Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc. Natl .Acad. Sci. U S A* *97*, 3579-3584.

Nakamura, A., Arai, H., and Fujita, N. (2009). Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. *J. Cell Biol.* *187*, 607-614.

Nigg, E.A. (2007). Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol.* *17*, 215-221.

Nigg, E.A., and Raff, J.W. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* *139*, 663-678.

Nigg, E.A., and Stearns, T. (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1154-1160.

Ojasoo, T., Fiet, J., Raynaud, J. P., and Doré, J. C. (1993). A multivariate approach to the description of patient populations. An example of the analysis of the hormone profiles of patients with advanced prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *46*, 183-193.

Oliveira, R.A., and Nasmyth, K. (2013). Cohesin cleavage is insufficient for centriole disengagement in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *23*, 601-603.

Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., et al. (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* *441*, 53–61.

Schockel, L., Mockel, M., Mayer, B., Boos, D., and Stemmann, O. (2011). Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat. Cell Biol.* *13*, 966-972.

Sluder, G., and Rieder, C.L. (1985). Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles. *J. Cell Biol.* *100*, 887-896.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E.A., and Peters, J.M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* *9*, 515-525.

Suzuki, H., Akiyama, N., Tsuji, M., Ohashi, T., Saito, S., and Eto, Y. (2006). Human Shugoshin mediates kinetochore-driven formation of kinetochore microtubules. *Cell Cycle* *5*, 1094-1101.

Thein, K.H., Kleylein-Sohn, J., Nigg, E.A., and Gruneberg, U. (2007). Astrin is required for the maintenance of sister chromatid cohesion and centrosome integrity. *J. Cell Biol.* *178*, 345-354.

Tomkins, G.M., and Martin, D.W. Jr (1970). Hormones and gene expression. *Annu. Rev. Genet.* *4*, 91-106.

Tsou, M.F., and Stearns, T. (2006). Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* *442*, 947-951.

Tsou, M.F., Wang, W.J., George, K.A., Uryu, K., Stearns, T., and Jallepalli, P.V. (2009). Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Dev. Cell* *17*, 344-354.

Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* *400*, 37-42.

Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* *103*, 375-386.

Uzgiris, V.I., Whipple C.A., and Salhanick H.A. (1977). Stereoselective inhibition of cholesterol side chain cleavage by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology* *101*, 89-92.

Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* *103*, 399-410.

Wang, X., Yang, Y., and Dai, W. (2006). Differential subcellular localizations of two human Sgo1 isoforms: implications in regulation of sister chromatid cohesion and microtubule dynamics. *Cell Cycle* *5*, 635-640.

Wang, X., Yang, Y., Duan, Q., Jiang, N., Huang, Y., Darzynkiewicz, Z., and Dai, W. (2008). sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev. Cell* *14*, 331-341.

Watanabe, Y., and Kitajima, T.S. (2005). Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *360*, 515-521.

Weng, J. H., Liang, M. R., Chen, C. H., Tong, S. K., Huang, T. C., Lee, S.P., Chen, Y. R., Chen, C. T., and Chung, B. C. (2013). Pregnenolone activates CLIP-170 to promote microtubule growth and cell migration. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 636-642.

Xu, Z., Cetin, B., Anger, M., Cho, U. S., Helmhart, W., Nasmyth, K., and Xu, W. (2009). Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Mol. Cell.* *35*, 426-441.

謝辞

本研究は約 6 年間にわたり京都大学生命科学研究科 豊島文子教授の指導の下行われました。豊島先生には研究の楽しさや厳しさを技術補佐員の 1 年を含めて約 7 年間教えて頂きました。また、学会などに積極的に参加させていただき、発表や勉強する機会をたくさん経験させて頂きました。心より感謝いたします。松村繁助教には、この研究を進めるにあたって多くの助言や実験手技を教えていただきました。また、論文の発表にあたって、松村助教の協力なしでは成し遂げることができませんでした。深く感謝いたします。

小田裕香子助教にはタンパク精製や結合実験の解析を担当していただきました。データーにできなかった実験も含めて、沢山の助言を頂きました。心より感謝致します。

前川桃子博士には研究を進めるにあたり多くの助言を頂きました。石橋理基氏にはフローサイトメーター(Canto)の解析法を教えて頂きました。米田早織氏には公聴会の発表について多くの助言を頂きました。東浦千夏氏にはタンパク精製と結合実験の解析を担当していただきました。堀恵美氏、太田陽子氏には実験に必要な試薬の準備をお手伝い頂きました。彼らの協力なしでは実験の遂行はできませんでした。心より感謝致します。さらに後輩の一橋遼氏、上月智司氏により研究生活を楽しく過ごせました。心より感謝致します。

京都大学大学院薬学研究科製剤機能解析学分野の石濱泰教授、佐藤綾香氏、高橋知里氏にはリン酸化プロテオーム解析を行っていただきました。京都大学大学院生命科学研究科シグナル伝達分野の西田栄介教授にはマイクロインジェクションの IM-188 apparatus (Narishige)を使用させていただきました。京都大学大学院生命科学研究科高次遺伝情報学の米原伸教授には公聴会の発表につい

て多くの助言を頂きました。京都大学大学院生命科学研究科の竹安邦夫教授、吉田藍子氏、出口確氏には脂質とタンパク質の結合解析に多くの助言を頂きました。帝京平成大学薬学部薬学科の高橋美樹子教授には **kendrin** の抗体をご分与いただきました。兵庫医科大学医学部福岡あゆみ博士にはフローサイトメーター(**Aria**)の解析法を教えてくださいました。皆様に心より感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Pregnenolone Functions in Centriole Cohesion During Mitosis

Mayumi Hamasaki, Shigeru Matsumura, Ayaka Satou, Chisato Takahashi,
Yukako Oda, Chika Higashiura, Yasushi Ishihama, Fumiko Toyoshima

Chemistry & Biology, in press, 2014